

# **Er cysteinproteasene legumain og cathepsin B involvert i statinindusert myotoksisitet?**

Masteroppgave for graden Master i farmasi



**Linn Løkken Jacobsen**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,  
Farmasøytisk institutt,  
Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet,  
UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

# **Er cysteinproteasene legumain og cathepsin B involvert i statinindusert myotoksisitet?**

Masteroppgave for graden Master i farmasi

**Linn Løkken Jacobsen**



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,

Farmasøytisk institutt,

Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet,

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012

## **Veiledere:**

Professor Rigmor Solberg

Professor Harald Thidemann Johansen

Professor Hege Thoresen

Stipendiat Robert Smith

© Linn Løkken Jacobsen

2012

Er cysteinproteasene legumain og cathepsin B involvert i statinindusert myotoksisitet?

Linn Løkken Jacobsen

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Os

# Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap under veiledning av professor Rigmor Solberg, professor Harald Thidemann Johansen, professor Hege Thoresen og stipendiat Robert Smith.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til mine hovedveiledere Rigmor Solberg og Harald Thidemann Johansen for fremragende veiledning, inspirerende diskusjoner, hjelp i skriveprosessen og for at døren alltid har stått åpen. Takk til Hege Thoresen for å ha svart på muskelrelaterte spørsmål og for å ha sett på resultatene med nye friske øyne. En spesiell takk til Robert Smith som har vært en fantastisk sparringspartner både under forsøksplanleggingen, på laboratoriet og under skriveprosessen.

Jeg vil også takke Hilde Nilsen for god opplæring i det praktiske arbeidet på laboratoriet, hyggelige samtaler og for å ha fullført de siste immunoblottene for meg. Takk til Camilla Stensrud for å ha svart på muskelrelaterte spørsmål, og for å ha laget dyrkningsmedier til ”den store gullmedalje”. Videre vil jeg takke Anders Åsberg og Ine Skottheim Rusten for at jeg har fått benytte meg av AMD-donorene, og professor Eva Skovlund for statistiske innspill.

Dette året hadde ikke vært det samme uten det sprudlende miljøet i 4. etasje, ”farmasijentene” mine og gjengen på kontor 410. Stor takk til medstudent Anny for utveksling av erfaringer, mye latter og underholdende sang på labben.

Jeg vil også rette en stor takk til Margrethe Sunde som har heiet på meg gjennom dette året, og gitt meg energi og pågangsmot.

Takk til mamma og pappa for å ha hatt troen på meg og støttet meg gjennom disse 5 årene. Sist, men ikke minst, vil jeg takke min kjære Henrik for tålmodighet, støtte og oppmuntring.

Blindern, mai 2012.

Linn Løkken Jacobsen

# Innholdsfortegnelse

<b>Summary in English.....</b>	<b>1</b>
<b>Sammendrag.....</b>	<b>3</b>
<b>Forkortelser .....</b>	<b>5</b>
<b>1 Innledning .....</b>	<b>2</b>
1.1 Hyperlipidemi.....	2
1.1.1 Definisjon.....	2
1.1.2 Årsaker .....	2
1.1.3 Terapianbefalinger .....	2
1.2 HMG-CoA-reduktasehemmere (statiner) .....	3
1.2.1 Virkningsmekanisme.....	3
1.2.2 Fysikalsk-kjemiske egenskaper og farmakokinetikk .....	4
1.3 Muskelbivirkninger av statiner .....	5
1.3.1 Skjelettmuskulatur.....	5
1.3.2 Klassifisering og symptomer.....	6
1.3.3 Prevalens .....	7
1.3.4 Diagnostisering.....	7
1.3.5 Predisponerende faktorer for muskelbivirkninger av statiner .....	8
1.3.6 Mulige mekanismer for statininduserte muskelbivirkninger .....	9
1.4 Proteaser .....	14
1.4.1 Legumain.....	15
1.4.2 Cathepsin B og L.....	17
1.4.3 Lysosomene og cathepsinenes rolle i apoptose.....	18
1.5 Mål for oppgaven.....	21
<b>2 Materialer og metode .....</b>	<b>22</b>
2.1 Materialer.....	22
2.2 Donorkarakteristika .....	23
2.3 Celledyrking .....	25
2.3.1 Utsåing av satelittceller .....	25
2.3.2 Proliferasjon og differensiering av myoblaster til myotuber .....	25
2.3.3 Stimulering med simvastatin og mevalonat .....	26
2.3.4 Høsting av myotuber .....	26

2.4	Totalproteinmåling .....	26
2.5	Enzymaktivitetsmåling .....	27
2.6	Immunoblotting (Western blotting).....	27
2.7	Celleviabilitetsmåling (MTS) .....	29
2.8	“Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) .....	30
2.9	Revers-transkripsjon-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real-time-PCR) .....	30
2.9.1	Isolering og kvantifisering av RNA .....	31
2.9.2	Komplementært DNA (cDNA)-syntese .....	31
2.9.3	Real-time PCR.....	31
2.10	Substrat-oksidasjonsmetoden.....	33
2.11	Statistiske analyser.....	34
<b>3</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>36</b>
3.1	Legumain og cathepsin B ekspresjon og aktivitet i primære humane skjelettmuskelceller .....	36
3.2	Effekt av simvastatin på morfologi av skjelettmuskelceller.....	38
3.3	Effekt av simvastatin på celleviabilitet.....	39
3.4	Effekt av simvastatin på legumain og cathepsin B i skjelettmuskelceller fra <i>M. obliquus internus abdominis</i> .....	40
3.5	Effekt av simvastatin på legumain og cathepsin B i skjelettmuskelceller fra <i>M. vastus lateralis</i> .....	43
3.6	Sammenligning av proteaseaktiviteter i myotuber fra ulike muskeldonorer.....	45
3.7	Effekt av simvastatin på mRNA-ekspresjonen av legumain, cathepsin B, cathepsin L og cystatin E/M i humane myotuber .....	46
3.8	Effekt av simvastatin med eller uten mevalonat på cellemorfologi og legumain .....	48
3.9	Effekt av simvastatin med eller uten mevalonat på glukoseoksidasjon og -opptak ..	51
<b>4</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>55</b>
4.1	Valg av cellemodeller .....	56
4.2	Valg av simvastatin- og mevalonatkonsentrasjoner .....	57
4.3	Karakterisering av legumain og cathepsin B under differensieringen av myoblaster til myotuber .....	59
4.4	Simvastatin påvirker cellenes morfologi og reduserer viabiliteten .....	60
4.5	Simvastatin med eller uten mevalonat hemmer uttrykk og aktivitet av legumain og cathepsin B .....	62
4.6	Simvastatin påvirker mRNA-ekspresjonen .....	66

4.7 Simvastatin med eller uten mevalonat påvirker mitokondrie-respirasjonen .....	67
<b>5 Konklusjon.....</b>	<b>70</b>
<b>Veien videre .....</b>	<b>71</b>
<b>Litteraturliste.....</b>	<b>72</b>
<b>Appendiks .....</b>	<b>1</b>
1. Celledyrking .....	1
2. Totalproteinmåling .....	2
3. Enzymaktivitetsmåling.....	2
4. Immunoblotting (Westernblotting) .....	2
5. “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) .....	3
6. RT-real-time-PCR .....	3
7. Substrat-oksidasjonsmetoden .....	4
8. Acetonfelling av proteinprøver til immunoblotting .....	4
9. Poster.....	5

## Summary in English

Statins (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors) are widely prescribed drugs used to treat hypercholesterolemia and to reduce cardiovascular events. Statins are generally well tolerated, but are known to induce myotoxicity in skeletal muscle, ranging from mild myopathy to serious rhabdomyolysis. Simvastatin has the highest incidence of myotoxicity compared to the other statins and the statin lactone forms have higher myotoxic potential than their respective acid forms. The mechanism of statin-induced myotoxicity is not yet fully understood and several hypotheses have been proposed. One hypothesis is that statins triggers the mitochondrial pathway of apoptosis through the activation of caspase 3 and 9. In this study, expression and activity of two other cysteine proteases (legumain and cathepsin B) are investigated in primary human skeletal muscle cells after treatment with simvastatin *in vitro*. Legumain and caspases belong to the same clan (CD) of cysteine proteases, and have common characteristics in their catalytic motif, similar features in their protein folds and they both show specificity towards substrates with a specific aminoacid in the P1 position. Furthermore, legumain has been shown to cleave cathepsin B which participates in the signaling pathway of apoptosis. Although a role of legumain in apoptosis has not been described yet, it has been suggested that legumain has an antiapoptotic effect in tumors.

As model systems, primary human skeletal muscle cells isolated from *M. obliquus internus abdominis* from healthy donors and *M. vastus lateralis* from healthy donors as well as from patients who experienced myotoxic symptoms after treatment with atorvastatin, have been used. Fully differentiated myotubes were treated with simvastatin for 24 or 48 hours. To verify that the simvastatin effects were due to disruption in the mevalonate pathway, myotubes were treated with simvastatin in the presence of mevalonate as well. The proteases were analyzed by immunoblotting, real time-PCR and ELISA. Enzyme activities were measured using specific peptide substrates. Cell viability was analyzed by MTS-measurements and the mitochondrial respiration (CO<sub>2</sub>) was investigated by a substrate oxidation assay.

The results have shown that both expression and activity of legumain and cathepsin B were increased during seven days of differentiation from myoblasts to myotubes. Treatment with simvastatin (0-50 µM) showed a dose-dependent decrease in both legumain and cathepsin B



activities. Although cathepsin B expression tended to increase at both the mRNA and protein levels after treatment of simvastatin, the expression of legumain showed the opposite response. The reduction in protein expression and activity observed for legumain is probably due to the observed decrease in mRNA expression. Treatment of simvastatin also changed the cell morphology, but a significant decrease in cell viability was only observed after exposure to 50  $\mu$ M simvastatin. Furthermore, simvastatin impaired the mitochondrial respiration in a dose-dependent manner. The abovementioned effects of simvastatin were partly reversed by mevalonate, which indicates that the effects are partly independent of the HMG-CoA reductase inhibition by simvastatin. There was no observed difference in the effects of simvastatin from non-myotoxic-sensitive (healthy donors) compared to myotoxic-sensitive (atorvastatin treated donors) myotubes. Additional research needs to be done to conclude whether or how legumain and cathepsin B contribute in statin-induced myotoxicity.

# Sammendrag

Statiner (3-hydroksy-3-metylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA)-reduktase) forskrives i utstrakt grad for behandling av hyperlipidemi og for å redusere kardiovaskulære hendelser. Statiner er vanligvis godt tolererte legemidler, men muskelrelaterte bivirkninger i form av mild myopati til mer alvorlig rhabdomyolyse forekommer hos enkelte pasienter. Forekomsten av muskelbivirkninger er høyest for simvastatin, og laktonformen av statiner er generelt vist å ha høyere myotoksisk potensiale enn den respektive syreformen. Mekanismen bak de statininduserte muskelbivirkningene er ikke fullstendig klarlagt, og det foreligger flere hypoteser i litteraturen. En av hypotesene er at statiner induserer apoptose gjennom den mitokondrielle signalveien ved aktivering av caspase-3 og -9. I denne oppgaven ble effekten av simvastatin på ekspresjon og aktivitet av to andre cysteinproteaser (legumain og cathepsin B), studert i primære humane skjelettmuskelceller i kultur. Legumain tilhører den samme klanen (CD) av cysteinproteaser som caspasene, og har strukturlikhet med caspasene i det katalytiske setet, har liknende proteinfolding og begge spalter substrater med en spesifikk aminosyre i P1-posisjon. Videre er cathepsin B vist å være et substrat for legumain, og er involvert i apoptoseprosessen i likhet med caspasene. Hvorvidt legumain også har en rolle i apoptose er uklart, men legumain ser ut til å ha en beskyttende effekt mot apoptose i tumorer.

Primære humane skjelettmuskelceller isolert fra *M. obliquus internus abdominis* fra friske frivillige og fra *M. vastus lateralis* fra både friske frivillige samt fra pasienter med muskelbivirkninger ved behandling med atorvastatin, ble benyttet som cellemodeller. For å studere effekten av statiner på ferdig differensierte myotuber ble disse behandlet med simvastatin i 24 eller 48 timer. For videre å verifisere om simvastatineffekten skyldtes en hemming av mevalonatsynteseveien, ble myotubene behandlet med simvastatin sammen med mevalonat. Proteasene ble analysert ved immunoblotting, real-time-PCR, ELISA og enzymaktivitetsmåling. Celleviabiliteten ble analysert ved MTS-målinger og den mitokondrielle respirasjonen ble undersøkt ved en substrat-oksidasjonsmetode.

Resultatene viser at både ekspresjon og aktivitet av legumain og cathepsin B øker ved differensiering av myoblaster til myotuber. Behandling av myotuber med simvastatin (0-50 µM) ga en doseavhengig reduksjon i aktiviteten av både legumain og cathepsin B. Selv om protein- og mRNA-ekspresjonen av cathepsin B økte ved simvastatinbehandling, ble legumain-ekspresjonen redusert. Den observerte reduksjonen i legumainaktivitet og -

proteinekspresjon, kan skyldes reduksjon i mRNA-ekspresjon, som også ble observert. Simvastatinbehandling påvirket også cellemorfologien og -viabiliteten, men en signifikant reduksjon i celleviabilitet ble ikke observert før ved tilsetning av 50  $\mu$ M simvastatin. Videre ble den mitokondrielle respirasjonen svekket ved økende doser av simvastatin. De overnevnte simvastatineffektene ble delvis reversert ved inkubering av simvastatin sammen med mevalonat. Dette kan tyde på at de nevnte hemmende effektene av simvastatin til en viss grad er uavhengig av hemmingen av HMG-CoA-reduktase. Det var ingen signifikante forskjeller mellom myotuber fra de friske donorene sammenlignet med donorene med muskelbivirkninger etter atorvastatinbehandling. Flere studier er nødvendig for å kartlegge om og hvordan legumain og/eller cathepsin B deltar i mekanismen for statinindusert myotoksisitet.

# Forkortelser

36B4	“Human acidic ribosomal phosphoprotein PO”
Acetyl-CoA	Acetyl-coenzym A
ADP	Adenosindifosfat
AEP	Asparaginyln endopeptidase
Ala	Alanin
ANOVA	“Analysis of variance”
AMD	Atorvastatin muskeldonor
Apaf-1	Apoptoseaktiverende faktor 1
ATP	Adenosintrifosfat
AUC	Arealet under kurven
BMI	“Body mass index”
BSA	Bovint serum albumin
CA	Celleassosiert
cDNA	Komplementær DNA
CK	Kreatinkinase
C <sub>maks</sub>	Maksimal plasmakonsentrasjon
CO <sub>2</sub>	Karbondioksid
Ct	“Cycle threshold”, deteksjonsgrense
CYP	Cytokrom P450
Cys	Cystein
DDD	Definerte døgndoser
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagles Medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonnukleinsyre
DEPC-H <sub>2</sub> O	Dietylpyrokarbonat-behandlet destillert vann
DTT	Ditiotreitol
ECL	“Enhanced chemiluminiscense”
ECM	Ekstracellulær matriks
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
ER	Endoplasmatisk reticulum
FCCP	Karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenylhydrason
FDA	“Food and Drug Administration”
FPP	Farnesylpyrofosfat

---

GAPDH	Glyseraldehyd-3 fosfatdehydrogenase
GGPP	Geranylgeranylpyrofosfat
Gly	Glysin
GPP	Geranylpyrofosfat
HDL	“High-density” lipoprotein
H-donor	Human donor
HEK	“Human embryonic kidney”
His	Histidin
HMG-CoA	3-hydroksy-3-metylglutaryl-coenzym A
HRP	“Horseradish peroxidase”
IC <sub>50</sub>	“Half maximal inhibitory concentration”
IPP	Isopentylpyrofosfat
kDa	Kilodalton
LD-donor	Levende donor
LDL	“Low-density” lipoprotein
LMP	Lysosomal membranpermeabilitet
LPS	Lipopolysakkarid
M38L-celler	Legumain-transfekte HEK 293 celler
MHC	“Major histocompatibility complex”
ML	Mevalonolakton
mRNA	“Messenger”-RNA
MTS	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfentyl)-2-(4-sulfofenyl)-H-tetrazolium
NADH	Nikotinamid adenindinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenindinukleotid fosfat
O <sub>2</sub>	Oksygen
OATP1B1	Organisk aniontransportør, familie 1B1
OD	Optisk tetthet
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PES	Fenazine etosulfat
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
RD	“Reagent dilution”
RNA	Ribonukleinsyre
ROS	Reaktive oksygenforbindelser

Rpm	Runder per minutt
RT	Revers transcriptase
RYR	Rød fermentert ris
RYR	Ryanodinreseptor
Sec-tRNA	Selenocystein-tRNA
SEM	Standardfeil
SL	Simvastatinlakton
SLCO1B1	“Solute carrier” organisk aniontransportør, familie 1B1
SR	Sarkoplasmatisk reticulum
TG	Triglyserid
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
tRNA	Transport-RNA
UGT	Uridin difosfat-glukoronosyl-transferase
VLDL	“Very low-density” lipoprotein
XIAP	X-kromosomkoblet hemmer av apoptose
Z-Ala-Ala-Asn-NHMec	Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-amino-4-metylkumarin
Z-Arg-Arg-AMC	Benzyloksykarbonyl-arginin-arginin-7-amino-4-metylkumarin

# 1 Innledning

## 1.1 Hyperlipidemi

### 1.1.1 Definisjon

Hyperlipidemi er definert som unormalt høye konsentrasjoner av kolesterol, kolesterolestere, triglyserider eller fosfolipider. Den kliniske relevansen av hyperlipidemi avhenger av hvilke lipider som er forhøyet og i hvilken grad, og det er derfor ikke fastsatt absolutte grenseverdier for optimale lipidnivåer. Ved utredning av hyperlipidemi vurderes derfor årsakene til forstyrret lipidbalanse og den totale risikoen for hjerte- og karsykdom før en eventuell medikamentell behandling iverksettes [1-3].

### 1.1.2 Årsaker

Årsaken til hyperlipidemi er ofte multifaktoriell og kan skyldes primære årsaker som genetikk og/eller sekundære årsaker som andre sykdommer eller livsstil. Ved primære årsaker forekommer det enkle eller multiple genmutasjoner som resulterer i enten overproduksjon eller defekt i "clearance" av triglyserider (TG) og "low-density" lipoprotein (LDL)-kolesterol, eller en redusert produksjon eller høy grad av "clearance" av "high-density" lipoprotein (HDL)-kolesterol. Sekundære årsaker til hyperlipidemi kan være livsstil med lav grad av fysisk aktivitet og et høyt inntak av næring som inneholder mettet fett, kolesterol og transfett eller et høyt inntak av alkohol. Sykdommer som diabetes mellitus, hypotyreose, galle- og leversykdommer og kroniske nyresykdommer kan bidra til hyperlipidemi. Legemidler som tiazider,  $\beta$ -blokkere, retinoider, østrogener, progestiner, aktive antiretrovirale midler og glukokortikoider kan også påvirke lipidprofilen negativt [1, 2].

### 1.1.3 Terapianbefalinger

Dersom ikke-medikamentell behandling i form av livsstilsendring og kostråd ikke er tilstrekkelig, bør medikamentell behandling vurderes som primærprofylakse ved hyperlipidemi. Helsedirektoratet har utarbeidet "Nasjonale retningslinjer for individuell primærforebygging av hjerte- og karsykdommer" med risikotabeller som kan benyttes sammen med den totale kliniske vurderingen, for å avgjøre om det skal initieres

medikamentell behandling [3]. Det foreligger god dokumentasjon på flere statiner for primærforebygging av hjerte-karsykdom (morbidity) og ved sekundærforebygging etter etablert kardiovaskulær sykdom (mortalitet) [1, 2, 4]. Statiner regnes på bakgrunn av dette som førstehåndspreparat både i primærprofylakse ved hyperlipidemi og som sekundærprofylakse etter påvist aterosklerose og hjerte- og karsykdom i Norge [3].

Andre lipidsenkende legemidler inkluderer gallesyrebindene resiner, nikotinsyrederivater, fibrater, kolesterolabsorpsjonshemmere og omega-3-fettsyrer [3]. Det finnes imidlertid ingen registrerte legemidler som inneholder nikotinsyrederivater og fibrater i Norge. I tillegg til de tradisjonelle lipidsenkende legemidlene benyttes rød fermentert ris (RYR) som lipidsenkende naturmiddel. Dette er hvit ris fermentert med soppene *Monascus purpureus*, *Monascus ruber* eller *Aspergillus terreus* [5]. I Norge forskrives det uregistrerte RYR-preparatet Hypocol®, og henvendelse til reseptregisteret viser at 1055 individer fikk forskrevet dette i 2011 mot 545 individer i 2007 [6].

## 1.2 HMG-CoA-reduktasehemmere (statiner)

Det er markedsført seks ulike statiner i Norge: lovastatin, simvastatin, pravastatin, atorvastatin, rosuvastatin og pitavastatin. Etter gjeldende refusjonsregler per 1. juni 2009 er alle doser av simvastatin og dosene 10, 20 og 40 mg atorvastatin foretrukne statiner i Norge. Simvastatin og atorvastatin er å finne på listen over de 10 mest solgte legemidlene angitt i definerte døgndoser (DDD) i Norge i 2011. Totalsalget av statiner øker for hvert år [7], og ca. 10 % (495 432 individer) av befolkningen hentet ut minst en resept på statiner i 2011 [8].

### 1.2.1 Virkningsmekanisme

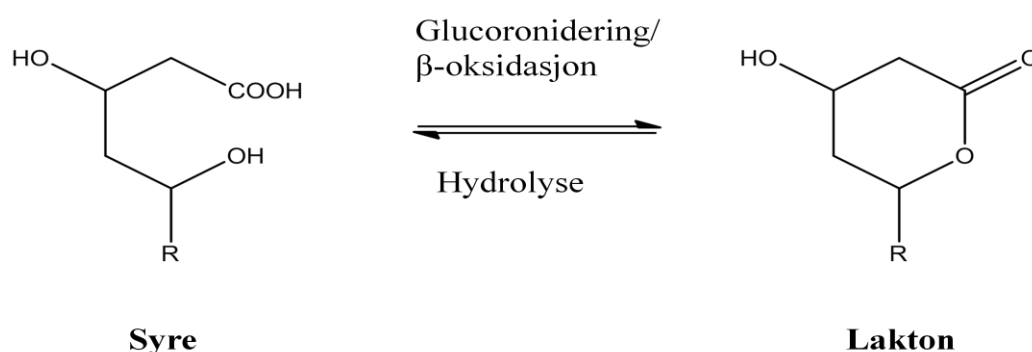
Statiner er spesifikke, reversible og kompetitive hemmere av enzymet 3-hydroksy-3-metylglutaryl-coenzym A (HMG-CoA)-reduktase. Enzymet inngår i det hastighetsbestemmende trinnet i mevalonatsynteseveien i den endogene syntesen av kolesterol. Hemmingen medfører en nedsatt egenproduksjon av kolesterol og en oppregulering av "low-density" lipoprotein (LDL)-reseptorer på overflaten av hepatocytene. Nedsatt egenproduksjon og økt opptak av LDL i hepatocytene resulterer i både en reduksjon av LDL og totalkolesterol i serum [1, 2]. Per dags dato kan det oppnås en gjennomsnittlig reduksjon i LDL på 31-63 % ved høyeste anbefalte dose av de markedsførte statinene. Rosuvastatin, som er det mest potente statinet, har den høyeste reduksjonen på 63 % [9]. Det



er vist i større studier at en reduksjon i LDL er proporsjonal med reduksjonen i risikoen for kardiovaskulære hendelser [10]. Statiner reduserer også nivåene av "very low-density" lipoproteiner (VLDL) ved å hemme produksjonen av apolipoprotein B i leveren og øker nivåene av "high-density" lipoproteiner (HDL) [9]. Det er vist at statinenes effekt i forhold til å forebygge koronare hendelser også kan skyldes såkalte pleiotrope effekter av statiner, det vil si tilleggseffekter utover den kolesterolsenkende effekten. Hypotesene bak de pleiotrope effektene innebærer blant annet forbedret endotelfunksjon, stabilisering av aterosklerotiske plakk og reduksjon av oksidativt stress. Statinene er også vist å virke anti-inflammatorisk og anti-prolifererende [11, 12]. Det er ikke kjent om de pleiotrope effektene er en klasseeffekt av statinene eller om effekten er doseavhengig.

### 1.2.2 Fysikalsk-kjemiske egenskaper og farmakokinetikk

De ulike statinene er forskjellige med hensyn på fysikalsk-kjemiske egenskaper. Simvastatin, lovastatin, atorvastatin og fluvastatin regnes som lipofile statiner, der simvastatin har høyest grad av lipofilisitet. Pravastatin er derimot mer hydrofil. Statiner administreres enten som lakton-prodrug (simvastatin og lovastatin) eller som aktiv syreform (atorvastatin, fluvastatin, rosuvastatin og pravastatin) [13]. *In vivo* foreligger statinene både på syre- og laktonform, og formene koeksisterer i likevekt for de fleste statiner [14-16]. Konverteringen mellom syre- og laktonform skjer ved hydrolyse,  $\beta$ -oksidasjon eller via uridindifosfat-glucuronosyl-transferase (UGT) 1A1, 1A3 og 2B7 (figur 1.1). Det er kun syreformen som hemmer HMG-CoA-reduktase via reversible ionebindinger til enzymet [14-16].



**Figur 1.1 Konvertering mellom syre- og laktonformen av statinene.** Modifisert fra [13]. R= resten av statinmolekylet. For simvastatin som er benyttet i denne oppgaven er R=C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>.

De ulike statinene har også forskjellige farmakokinetiske profiler. Dette innebærer ulik halveringstid, maksimal plasmakonsentrasjon ( $C_{maks}$ ), grad av proteinbinding, metabolisme, aktive metabolitter og eliminasjon [17]. Biotilgjengeligheten er relativt lav for alle statinene på grunn av høy grad av presystemisk metabolisme i tarm og lever. De fleste statinene metaboliseres av enzymkomplekset cytokrom P450, og hovedsakelig isoenzymet 3A4 med unntak av fluvastatin og pravastatin, som metaboliseres henholdsvis av CYP2C9 og via fase 2-metabolisme [17, 18].

### **1.3 Muskelbivirkninger av statiner**

Statiner er vanligvis godt tolererte legemidler og bivirkninger opptrer sjeldent. Bivirkninger som forekommer er gastrointestinale forstyrrelser, hudutslett, levertoksisitet og muskelrelaterte bivirkninger som myalgi, myositt, myopati og sjeldnere rabdomyolyse [19, 20].

#### **1.3.1 Skjelettmuskulatur**

Det foreligger ikke data på vevsspesifisitet for statiner i litteraturen, men skjelettmuskulatur eksponeres generelt i høy grad for legemidler på grunn av rik blodtilførsel og høy metabolsk aktivitet. Skjelettmuskulaturen utgjør ca. 45 % av den totale kroppsvekten [21].

Skjelettmuskelfibrene består av store flerkjernede celler, og klassifiseres inn i type I ("slow-twitch", langsomme) og type II ("fast-twitch", raske) fibre som har ulik evne til utholdenhet og kraftutvikling. Type I fibre utviser oksidativ metabolsk aktivitet med høyt innhold av mitokondrier, mens type II fibre hovedsakelig henter energi fra glykolysen. De oksidative type I fibrene er involvert i opprettholdelsen av kroppsstillingen, mens de glykolytiske type II fibrene er involvert i bevegelser som krever hurtighet og styrke [22-24]. Mengdeforholdet mellom fibrene varierer med ulik muskulatur, individ og treningsmengde. I tillegg er alder, kjønn og hormonstatus av betydning for sammensetningen av fibertypene [23]. Studier utført i rotter viser varierende resultater for hvilke fibertyper som påvirkes ved statinstimulering. De fleste studiene har demonstrert selektiv toksisitet på type II fibre, men Obayashi et. al. viste nylig (2011) at type I fibre påvirkes og ikke type II [23]. I både type I og type II fibrene er statintoksisitet observert blant annet som svelledede mitokondrier, aktiverte lysosomer og annen apoptotisk og nekrotisk morfologi [22, 23]. Toksisiteten på type I fibre var mer uttalt ved trening [23].

### 1.3.2 Klassifisering og symptomer

Muskelbivirkninger av statiner innebærer et bredt spekter av symptomer og noen relativt uspesifikke klinisk-kjemiske endringer. Terminologien for muskelbivirkninger er ikke konsekvent brukt i litteraturen, og tabell 1.1 viser nomenklatur i forbindelse med muskelbivirkninger [5, 20, 21, 25, 26]. Ofte benyttes begrepet myopati som et samlebegrep på muskelplager av statiner, og blir også benyttet i denne oppgaven.

**Tabell 1.1 Nomenklatur i forbindelse med muskelbivirkninger** Modifisert fra [5, 20, 21, 25, 26].

<b>Myalgi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diffuse muskelsmerter, muskelømhhet og/eller muskelsvakhet, hovedsakelig i proksimale muskler.</li> <li>• Uten kreatinkinase-stigning.</li> </ul>
<b>Myopati</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generelt begrep for subjektive muskelplager uavhengig av årsak.</li> <li>• Ofte myalgi, svakhet og/eller kramper.</li> <li>• Med kreatinkinase-stigning.</li> </ul>
<b>Myositt</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muskelsvakhet.</li> <li>• Karakteriseres av inflammasjon i muskulaturen. Biopsier viser infiltrasjon av inflammatoriske celler, nekrotisk vev og varierende fiberstørrelse.</li> <li>• Med eller uten kreatinkinase-stigning.</li> </ul>
<b>Rabdomyolyse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muskelsmerter, ømhhet og kramper.</li> <li>• Karakteriseres ved muskelcelledestruksjon og lekkasje av muskelcellekomponenter som myoglobin, kreatinkinase, kalium, hydrogenioner og fosfat. Kreatinkinase-verdiene øker ofte mer enn 10 ganger høyere enn øvre normalgrense.</li> <li>• Mulige komplikasjoner: hypovolemi, metabolsk acidose, akutt nyresvikt, intravaskulær koagulasjon, kardiomyopati, respirasjonssvikt og død.</li> </ul>

De vanligste symptomene på muskelbivirkninger av statiner er milde til moderate muskelsmerter, kramper og svakhet [27]. Muskelsymptomene kan opptre få dager etter oppstart med statin eller etter flere år [27, 28], og symptomene kan være kontinuerlige eller treningsinduserte. Ved trening opptrer symptomene som regel raskt, men kramper kan inntreffe opptil 24 timer etter trening. Er smerten/krampen manifestert, er den ofte vedvarende selv om fysisk aktivitet opphører. Fysisk aktivitet/trening ser ut til å øke antall muskler av ulik anatomisk lokalisasjon som involveres, samt øke alvorlighetsgraden av symptomene [27, 29].

Muskelsymptomene opptrer hovedsakelig i pectoralis-muskelen (brystmusklen), quadriceps-muskelen (muskelen på forsiden av låret), og i mindre grad i biceps (muskelen på overarmens forside), abdominal muskulatur (bukmuskulatur), masseter (tyggemuskulatur) og muskulaturen i nedre del av ryggen [27].

### 1.3.3 Prevalens

Da det ikke benyttes konsekvent terminologi på statininduserte muskelbivirkninger, er det vanskelig å gi et presist estimat på prevalensen. Muskelbivirkninger rapporteres med høyere insidens i observasjonsstudier sammenlignet med kliniske utprøvningsstudier, og kan være så høy som 10-15 %. De ulike statinenes potensiale til å indusere muskelbivirkninger rapporteres også ulikt i litteraturen. Myalgi er generelt angitt til å være den vanligste formen for muskelbivirkninger av statiner [5]. En estimering av bivirkningsrapportering for statiner til FDA ("Food and Drug Administration", USA) utført i 2011, viste følgende spontanrapporteringshyppighet med hensyn på både myalgi, rabdomyolyse og økning i kreatinkinase: simvastatin > atorvastatin > rosuvastatin > pravastatin [30]. Høy dose av simvastatin er vist å ha høyere myotoksisk potensiale enn maksimale doser av andre statiner [31].

Alvorligere rabdomyolyse er en svært sjelden bivirkning av statiner og forekommer hos 0,01 % av pasientene [5]. Rabdomyolyse er i 60 % av tilfellene oppgitt til å være relatert til legemiddelinteraksjoner, og er mest uttalt for statinene som metaboliseres av CYP3A4 [32]. Cerivastatin ble trukket frivillig fra markedet i 2001 på bakgrunn av høy insidens av rabdomyolyse, akutt nyresvikt og død ved både mono- og kombinasjonsterapi, sammenlignet med de andre statinene. Den høye insidensen kan blant annet forklares ved at cerivastatin har en annen farmakokinetisk profil, siden cerivastatin er mer potent og lipofil, samt har høyere grad av eliminering via nyrene enn de andre statinene [33].

### 1.3.4 Diagnostisering

Det finnes ingen gode biomarkører for å diagnostisere statininduserte muskelskader, og det er vanskelig å skille mellom trivielle somatiske plager av andre årsaker og milde bivirkninger av statiner. Serum-kreatinkinase benyttes som et mål på skjelettmuskelskade, og flere av dagens retningslinjer for diagnostikk og klassifisering av statinindusert muskelbivirkninger baserer seg på dette. Kreatinkinase (CK) er et intracellulært enzym i muskelceller som frigis til blod ved muskelcelleskade. Nyere studier har imidlertid vist at muskelcelleforandringer i biopsier ikke nødvendigvis sammenfaller med økte CK-nivåer i serum. Både muskelcelleforandringer og økte nivåer av CK er dessuten sene markører. Diagnostiseringen i dag baserer seg derfor i tillegg på eksklusjon av andre årsaker til muskelplagene og såkalt "re-challenge"-test. Ved en "re-challenge"-test seponeres statinet for så og reintroduseres etter 4-6 uker for å se om

symptomene kommer tilbake. Testen gjennomføres to ganger [20, 25]. En slik seponering vil ha liten innvirkning på den kardiovaskulære risikoen hos stabile pasienter. Alternativ strategi er dosereduksjon, dosering annenhver dag, bytte av statin eller kombinasjonsbehandling med andre kolesterolsenkende legemidler i lave doser [20].

### **1.3.5 Predisponerende faktorer for muskelbivirkninger av statiner**

Risikoen for å utvikle muskelbivirkninger av statiner bestemmes hovedsakelig av hvilket og hvilken dose statin som administreres, samt faktorer som påvirker farmakokinetikken til statinet [29]. De fysikalsk-kjemiske egenskapene til statinene [13, 34] og genetiske mutasjoner i skjelettmuskelrelaterte gener [35, 36], har også vist seg å spille inn på statinenes potensiale til å indusere myopati. Andre disponerende tilstander er hypertyreose, nedsatt lever- og nyrefunksjon, transplantasjoner og alvorlige infeksjoner [20].

#### **Betydningen av metabolisme og legemiddelinteraksjoner**

Da statinene i utgangspunktet har lav biotilgjengelighet, vil kombinasjon med legemidler eller næringsstoffer som øker biotilgjengeligheten eller hemmer eliminasjonen, øke risikoen for bivirkninger [17]. Økende alder som gir redusert funksjon i de eliminerende organene og polyfarmasi, er assosiert med økt risiko for myopati ved statinbruk [5, 17, 20]. Som nevnt tidligere metaboliseres de fleste statinene av CYP3A4. Ekspresjonen av CYP3A4 utviser individuell variabilitet, kan induseres eller inhiberes, noe som i høy grad påvirker biotilgjengeligheten av statinene da mer enn 50 % av legemidler som metaboliseres via CYP-enzymene benytter isoenzymet 3A4. Statinene har generell lav affinitet til CYP3A4, og er dermed utsatt for hemmere med høyere affinitet. Eksempel på potente hemmere av CYP3A4 er erytromycin, verapamil og itrakonazol. En hemming av statinmetabolismen medfører økt effekt/toksisitet, selv om det for prodrugene er metabolittene som utøver effekten [17]. En terapeutisk dose på 40 mg simvastatin daglig gir en maksimalkonsentrasjon på 10-34 ng/ml, som tilsvarer ca 25-80 nM [18, 37]. Ved en hemming av CYP3A4, kan plasmakonsentrasjonen øke med en faktor på 10-15 og en maksimalkonsentrasjon på 1,2 µM simvastatin kan dermed oppnås [18].

Farmakokinetiske interaksjoner kan også skje via den leverspesifikke opptakstransportøren OATP1B1, som transporterer statinene inn i hepatocytene for metabolisme og sekresjon i galle [20]. Det forekommer polymorfisme i *SLCO1B1*-genet som koder for OATP1B1, og genvarianten *SLCO1B1*\*5 predisponerer for statininduserte muskelbivirkninger [5, 20].

Ciklosporin er vist å hemme OATP1B1-mediert transport, og gir en klinisk relevant interaksjon med statiner [17].

Farmakodynamiske interaksjoner, som opptrer ved koadministrering av flere lipidsenkende legemidler, øker også risikoen for myopati [17].

### **Betydningen av de fysikalsk-kjemiske egenskapene**

Det har blitt vist at laktonformen til fluvastatin, pravastatin, simvastatin og atorvastatin har høyere myotoksisk potensiale enn korresponderende syreform *in vitro*, og den toksiske effekten inntreffer raskere og er mer uttalt [13]. Plasmanivåene av atorvastatinlakton er også målt til å være høyere hos pasienter diagnostisert med muskelbivirkninger sammenlignet med friske frivillige [34]. Dette kan skyldes at syre- og laktonformene påvirker intracellulære signalveier ulikt, eller at de når intracellulære lokalisasjoner i ulik grad ved aktiv transport eller passiv diffusjon. Laktonformene har trolig en høyere grad av passiv transport over membranen, grunnet høyere grad av lipofilisitet. Forskjellen i myotoksisk potensiale mellom de overnevnte statinene er  $\text{simvastatinlakton} \approx \text{fluvastatinlakton} > \text{atorvastatinlakton} > \text{pravastatinlakton}$ . Lipofilisiteten kan bare forklare noe av forskjellen i grad av myotoksitet, da simvastatinlakton og atorvastatinlakton har liknende lipofile egenskaper [13]. Liknende studier utført på syreformene av statinene, ga den samme rekkefølgen i myotoksisk potensiale [38].

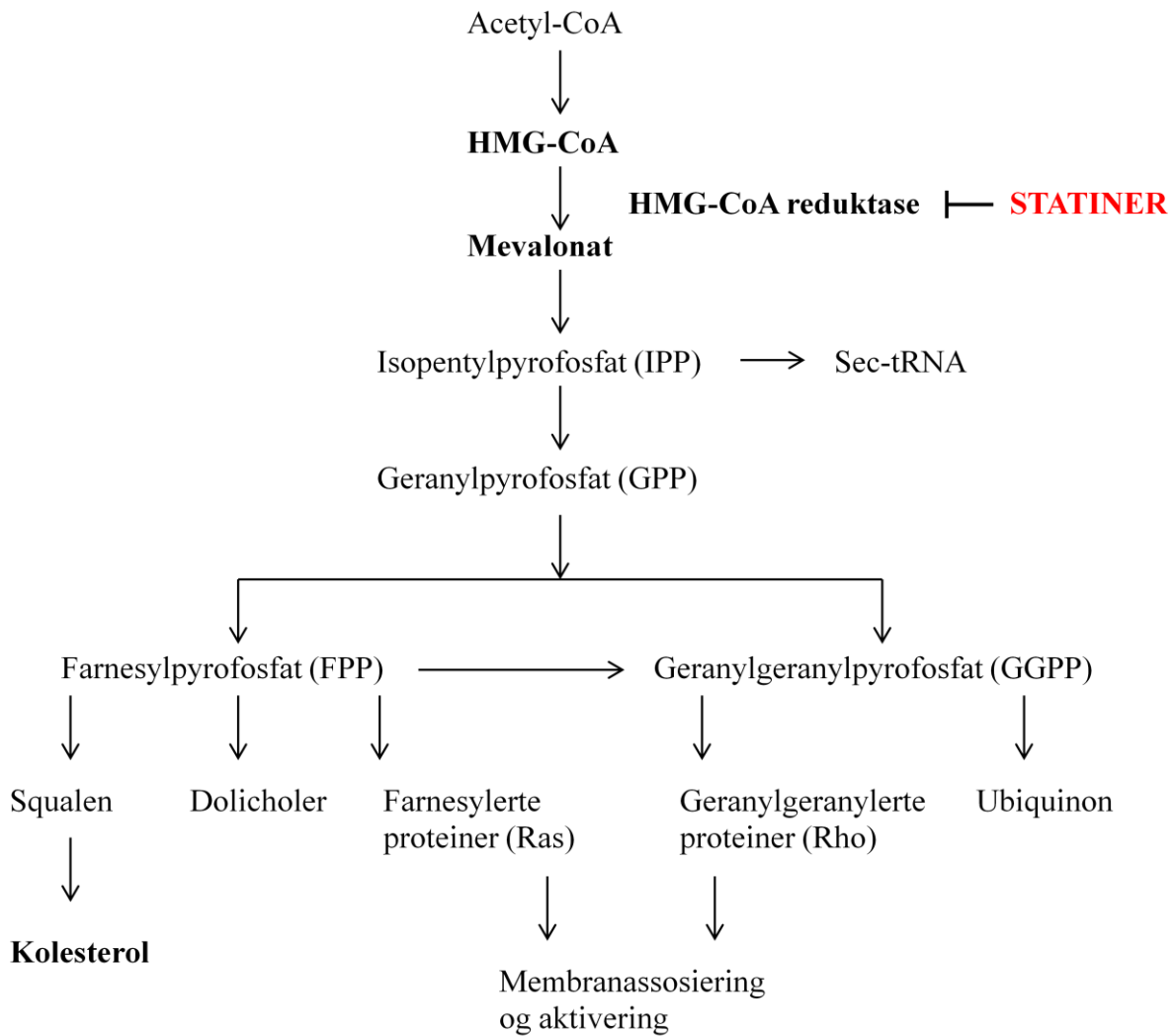
### **Betydningen av genetiske mutasjoner**

Genetisk predisposisjon og underliggende metabolske muskelsykdommer er også vist å spille en rolle ved statinindusert myopati. Ti % av pasientene som står på lipidsenkende behandling, har mutasjoner i gener som er involvert i og som medfører forstyrrelser i lipidoksidasjonen, mobiliseringen av glukose fra glykogenlagre i muskelvev og defekt muskelkontraksjon [36]. I tillegg har flere pasienter som opplever myopati ved statinbehandling påvist mutasjoner i gener som er involvert i kalsiumhomeostasen [35]. Det kan tenkes at UGT-polymorfisme og forskjøvet likevekt mellom syre- og laktonformen av statiner kan spille inn på grad av toksitet, men dette er ikke studert [20].

## **1.3.6 Mulige mekanismer for statininduserte muskelbivirkninger**

Mekanismene ansvarlig for statinindusert myotoksitet er ikke fullstendig klarlagt og skyldes trolig flere faktorer. Myotoksiteten kan skyldes den farmakologiske hovedeffekten av

statinene og redusert dannelse av nedstrømsprodukter i mevalonatsynteseveien (indirekte effekt, figur 1.2), eller den kan skyldes en direkte effekt på ulike cellulære komponenter [39]. Hypotesene som foreligger i litteraturen er nevnt under:



**Figur 1.2 Forenklet fremstilling av mevalonatsynteseveien.** Statiner hemmer HMG-CoA-reduktase som fører til en reduksjon i dannelsen av mevalonat og andre nedstrømsprodukter i mevalonatsynteseveien. Mevalonat er ikke bare en forløper for kolesterol, men også for intermediære isoprenoidmetabolitter (IPP, GPP, FPP og GGPP). Disse metabolittene inngår blant annet i syntesen av t-RNA, glykoproteiner og proteiner i elektrontransportkjeden i mitokondriene. I tillegg bidrar isoprenoidmetabolittene til posttranslatorisk modifisering av proteiner (prenylering), som de små G-proteinene Rho og Ras som er involvert i celledsignering og apoptose. PP= pyrofosfat. Modifisert fra [5, 40].

### **Endret lipidsammensetning i cellemembranen**

Kolesterol inngår som en bestanddel i plasmamembranen, og foreligger i en bestemt ratio med fosfolipider. Reduserte kolesterolnivåer kan endre fluiditeten i plasmamembranen, påvirke natrium-, kalium- og kloridkanaler og derved modifisere opprettholdelsen av membranen. Endret membransammensetning har vært observert hos pasienter behandlet med statiner [39], men den samme tendensen er imidlertid ikke observert *in vitro* ved hemming av squalensyntetase som omdanner squalen til kolesterol. Nedarvede sykdommer i kolesterol synteseveien som medfører reduserte kolesterolnivåer, gir heller ikke klinisk myopati [5, 40].

### **Redusert produksjon av selenoproteiner**

Selenoprotein N spiller en viktig rolle i myogenesen og myoregenereringen. Selenocystein-tRNA (Sec-tRNA) er essensiell for selenoproteinenes funksjon. Statiner har vist å hemme isopentenyleringen av selenocystein-tRNA (Sec-tRNA). Isopentylpyrofosfat (IPP) som benyttes som substrat for modifiseringen av Sec-tRNA, er et nedstrømsprodukt i mevalonatsynteseveien. Selenmangel i seg selv har også vist seg å predisponere for myopati [40].

### **Redusert produksjon av prenylerte proteiner**

Andre viktige isoprenoider i mevalonatsynteseveien er farnesylpyrofosfat (FPP) og geranylgeranylpyrofosfat (GGPP). Disse isoprenoidene bindes kovalent til proteiner post-translatorisk, og en redusert proteinprenylering reduserer dermed også modifiseringen av proteiner og kan fremme alternative modifiseringer. Modifiseringen er viktig for proteinenes funksjon og intracellulær signalering. Eksempel på proteiner som prenyleres er lamina, ubiquinon og de membranassosierte proteinene Ras og Rho (små G-protein). Redusert protein-prenylering kan tenkes å gjøre cellene mer følsomme for mekanisk stress, gi degenerering og svelling av organeller, øke cytosolisk kalsium for deretter aktivering av caspase-3 og celledød ved apoptose [5, 40]. I noen celletyper er apoptose stimulert ved en hemming av geranylgeranylering og Rho-signalveien, mens en hemming av farnesylering ikke induserer apoptose. Koadministrering av statin med GGPP i de samme celletypene, motvirket apoptose, mens FPP hadde liten eller ingen motvirkende effekt [39]. Statinindusert apoptose i myoblaster fra L6-rotter viste derimot en assosiasjon med reduserte nivåer av membran-farnesylert Ras, heller enn geranylgeranylert Rho. Koadministrering av GGPP eller FPP med statin i vaskulære glatte muskelceller, motvirket i begge tilfeller apoptose [39].



**Redusert dannelse av ubiquinon**

Mevalonat er forløper for ubiquinon (Coenzyme Q) som inngår som elektronbærer i den mitokondrielle respirasjonsskjeden og reduserte nivåer av ubiquinon vil føre til svekket ATP-syntese. Statiner er vist å redusere serumkonsentrasjonen av ubiquinon. Dette kan skyldes en direkte effekt på redusert syntese, men også en indirekte effekt på grunn av reduserte mengder sirkulerende LDL som transporterer ubiquinon. Ubiquinonnivåene i skjelettmuskelcellene ser ikke ut til å påvirkes av statinbehandling og ubiquinontilskudd er ikke vist å motvirke eller forbedre statinindusert myopati [5, 39].

**Forstyrret kalsiumhomeostase**

Reguleringen av kalsiumhomeostasen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) mellom ekstracellulær matriks, cytosol, endoplasmatisk retikulum (ER) og sarkoplasmatiske retikulum (SR) er kritisk for kontraksjonen av muskelcellene. Aksjonspotensialet medierer åpning av L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -kanaler i cellemembranen og gir en influks av  $\text{Ca}^{2+}$ . Dette trigger åpningen av ryanodinreseptorene (RyR) i SR-membranen og effluks av  $\text{Ca}^{2+}$ , som ytterligere øker den cytosoliske intracellulære konsentrasjonen av  $\text{Ca}^{2+}$  som initierer muskelkontraksjon og som også kan stimulere aktiviteten til  $\text{Ca}^{2+}$ -følsomme proteiner som proteasen calpain [5, 39, 41]. Statiner er vist å forårsake økt effluks av  $\text{Ca}^{2+}$  fra SR, men denne effekten er ikke rask, noe som indikerer en indirekte mekanisme [39]. Biopsier fra pasienter med myopati har vist økt ekspresjon av RyR3-reseptorer og strukturelle forandringer i SR [5]. En økning i intracellulær  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjon påvirker cellenes eksitabilitet og initierer muskelkontraksjon ved lavere terskelnivåer enn normalt. Dette kan resultere i at kramper, myalgi og andre muskelbivirkninger lettere oppstår [41].

**Redusert dannelse av dolicholer**

Dolicholer er polyprenoler dannet fra FPP som overfører oligosakkarider under glykosyleringen av proteiner i endoplasmatiske retikulum (ER). Glykosyleringen fører til stabilitet av proteinene og mulighet for interaksjoner med ligander som for eksempel lamin, som er et viktig strukturprotein i kjernemembranen. Redusert dannelse av FPP vil gi redusert dannelse av dolicholer, og dermed redusert glykosylering av proteiner. Dette kan påvirke funksjonaliteten og den mekaniske integriteten til skjelettmuskelcellene [40].

### Autoimmun mekanisme

Autoimmun mekanisme for statinindusert myopati er også foreslått i litteraturen. Statiner kan trigge eller forverre autoimmune sykdommer som lupus, polymyositis og myasthenia, og er vist å indusere "major histocompatibility complex" (MHC)-II-avhengig aktivering av T-lymfocytter. I tillegg er det rapportert at statiner kan indusere myopati som skyldes immunmediert nekrose som krever immunsuppressiv behandling [5].

### Induksjon av apoptose

Det er blitt vist at statiner kan indusere apoptose i flere celletyper som glatte muskelceller, hjertemyocytter, pericytter (spesialiserte glatte muskelceller), revmatoid synovialceller (celler i leddslimhinnen) og flere kreftcelletyper [42, 43]. Ofte omtales dette som en fordelaktig pleiotrop effekt da det for eksempel kan redusere veksten av kreftceller eller redusere hypertrofi av hjertemuskulaturen. I skjelettmuskel derimot mener man at apoptose kan være involvert i utviklingen av myopati. Apoptose etter statinstimulering er vist *in vitro* i både myoblaster, myotuber og differensierte primære humane skjelettmuskelceller [37, 43, 44]. Statiner er også vist å redusere proteinsyntese, vekst, fusjon, og differensiering av myoblaster, og dermed kapasiteten til muskelregenerering [39]. Reduksjonen av viable celler er konsentrasjonsavhengig, og reduksjonen kan helt eller delvis reverseres ved koadministrering av mevalonat [37, 44]. Da koadministrering med mevalonat ikke alltid gjenoppretter statineffekten på cellelevabilitet, kan dette tyde på at en mekanisme uavhengig av mevalonatsynteseveien bidrar til statinenes toksiske effekt.

Resultater fra flere studier taler for at statinene trigger den mitokondrielle signalveien ved apoptose [37, 44]. Sacher et al. viste at simvastatin fører til en doseavhengig aktivering av caspase-9 og -3, i nevnt rekkefølge [37]. Caspase-8-aktivitet var ikke detekterbar. Aktiviteten til caspase-9 og -3 ble motvirket ved koadministrering av mevalonat. Videre ble det vist at Bax translokaliserte til mitokondriemembranen som respons på statinstimulering, noe som kan føre til økt permeabilitet og frigjøring av proapoptotiske proteiner som cytokrom c. Mevalonat motvirket akkumuleringen av Bax i mitokondriemembranen, og førte isteden til en akkumulering i ER og ikke redistribusjon til cytosol. Akkumuleringen av Bax i ER-membranen kan tenkes å frigjøre lagret  $\text{Ca}^{2+}$  og videre indusere apoptose ved aktivering av caspaser. Sacher et al. viste også at aktiviteten for den kalsiumavhengige proteasen calpain øker ved simvastatinstimulering, og dette motvirkes ikke av mevalonat [37]. Den proteolytiske aktiviteten til calpain aktiveres av langvarig økning i intracellulært  $\text{Ca}^{2+}$ -nivå.

En hemming av den intracellulære  $\text{Ca}^{2+}$ -økningen motvirket både calpain, caspase-3 og caspase-9 aktivering, og videre chelatering av intracellulært kalsium motvirket simvastatin-indusert celledød.

Nishimoto et al. viste at akutt stimulering av humane myocytter med statin reduserer den intracellulære konsentrasjonen av ATP, noe som tyder på at statinene også utøver en direkte effekt på mitokondriene [45]. Flere studier har vist at statiner reduserer den mitokondrielle repirasjonen [41, 44, 46, 47]. Resultatene viste et redusert  $\text{O}_2$ -opptak, redusert dannelselse av ATP og mitokondriell respirasjon nådde ikke sitt maksimale potensiale. Kwak et al. viste i tillegg at simvastatin induserer mitokondriemediert oksidativt stress [44]. Fysisk aktivitet øker den oksidative metabolismen i musklene, og vil trolig akselerere og forverre effekten simvastatin har på mitokondriene. Disse funnene støtter også opp om hypotesen om at statinene induserer apoptose via den mitokondrielle signalveien.

Bare én studie har så langt studert apoptose og apoptotiske markører i skjelettmuskel *in vivo*. Studien som ble utført av Seachrist et. al. [24] viste muskelødeleggelse i rotter etter 14 dagers statinbehandling med cerivastatin. Målingene av apoptotiske markører som caspase-3 og DNA-fragmentering ble utført 24 timer etter administrering, og viste ingen forskjell fra kontroll. Dette indikerer at apoptose kanskje ikke skjer *in vivo*, men målingene av apoptotiske markører ble foretatt på et tidlig tidspunkt og man kan ikke konkludere på bakgrunn av dette.

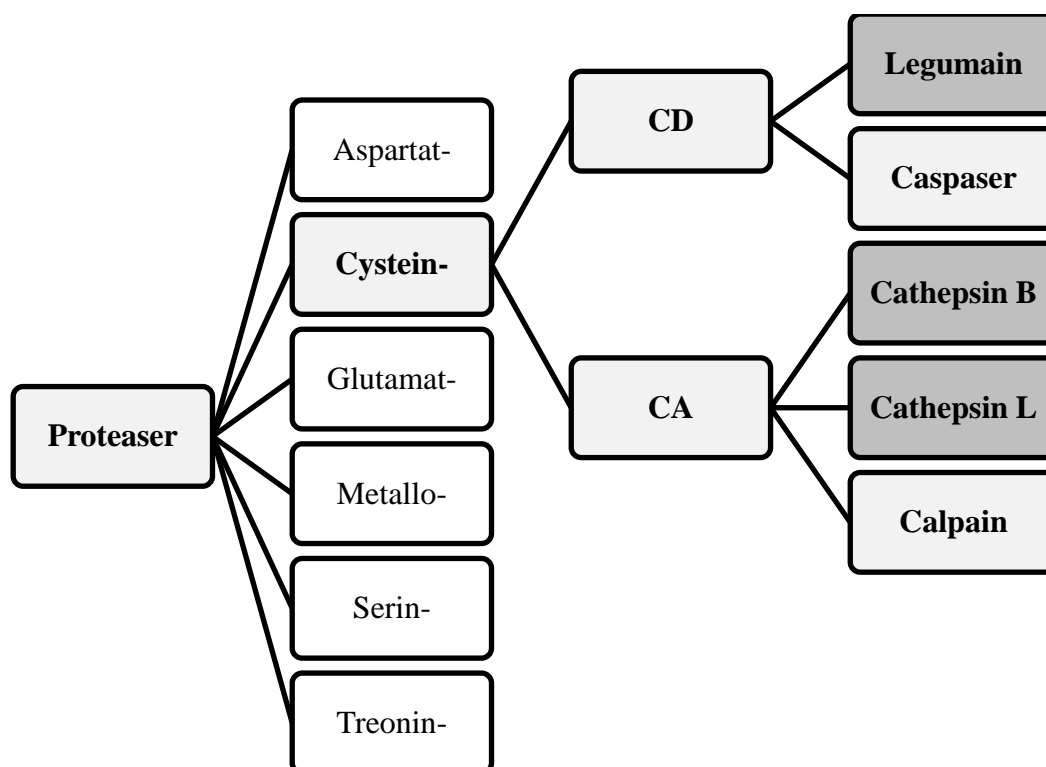
Bikarbonat kontrollerer intracellulær pH og koadministrering av biokarbonat med statin *in vitro* er vist å motvirke pH-forandringer, caspaseaktivering, morfologiske forandringer og reduksjonen i viabilitet [48].

## 1.4 Proteaser

Proteaser er proteolytiske enzymer som spalter peptidbindinger ved hydrolyse. Den proteolytiske aktiviteten bidrar til prosessering og nedbrytning av proteiner, samt inngår i intracellulære signalkaskader. Proteasene klassifiseres på bakgrunn av sitt katalytiske sete inn i aspartat-, cystein-, glutamat-, metallo-, serin- og treoninproteaser. Videre inndeles proteasene inn i eksopeptidaser som spalter substratet nær den terminale enden av polypeptidkjeden, eller endopeptidaser som spalter interne peptidbindinger i substratet [49].

Både legumain, cathepsin B og L er lysosomale cysteinproteaser. De har ulik molekylstruktur og tilhører ulike familier. Cathepsin B og L tilhører papainfamilien (C1), mens legumain

tilhører familien C13. Calpain og caspasene, som er involvert i apoptoseprosessen, er også cysteinproteaser og tilhører henholdsvis familiene C2 og C14. Cysteinproteasefamiliene inndeles i klaner på bakgrunn av strukturlikhet. Legumain og caspasene tilhører klanen CD, mens cathepsin B og L samt calpain tilhører CA klanen (figur 1.3) [50, 51].



**Figur 1.3 Inndeling av proteaser på bakgrunn av katalytisk sete og strukturlikhet.** Legumain, cathepsin B og L som er studert i denne oppgaven er markert i mørkere gråtone.

### 1.4.1 Legumain

Legumain er en endopeptidase som spesifikt hydrolyserer karboksylgruppen i asparagin i P1-posisjonen i substrater, og har derfor også fått tilnavnet asparaginy-endopeptidase (AEP). Legumain ble først beskrevet i planter og er senere karakterisert i blant annet parasitter og pattedyr, inkludert mennesket [52, 53]. Enzymet er som nevnt lokalisert i lysosomene, men legumain er også funnet i det ekstracellulære miljøet i tumorer hvor det er assosiert med cellemembranen eller matriks [54, 55]. Legumain er vist å forekomme i alle vev, men har høyest nivå i placenta og nyrer [56]. Ekspresjonen og aktiviteten i human skjelettmuskel er ikke studert.

Aktiveringen av legumain trigges av sur pH og skjer ved både autokatalyse og videre avspaltning mediert av andre proteaser. Sekvenser både i C- og N-terminal ende av proteasen

spaltes av under prosesseringen. Legumain syntetiseres som et preproenzym og modifiseres til et inaktivt zymogen (proenzym) under transporten til lysosomene. Prolegumain har en molekylvekt på 56 kDa, og er inaktivt da propeptidet blokkerer for det aktive setet. Ved en reduksjon i pH til under 5,5 prosesseres proformen ved autokatalyse til en intermediær form på 47 kDa. Ved en ytterligere reduksjon i pH prosesseres enzymet videre til en ny intermediær aktiv form på 46 kDa. *In vivo* skjer det en spaltning av 46 kDa-formen ved hjelp av andre proteaser til modent og aktivt legumain på 36 kDa [57, 58]. Legumain har stabil aktivitet i pH-intervallet 4,2-5,5, men har samtidig vist å ha maksimal aktivitet ved pH 6,4 [52].

Substrater som er identifisert for legumain er matriksproteinene fibronektin [59], cathepsin B, H og L, promatriksmetalloproteinase-2 (MMP-2; progelatinase A) [60] og  $\alpha$ -thymosin [61]. Legumain ser ut til å prosessere cathepsinene fra aktiv "single chain" videre til aktiv "two-chain" [52, 60]. På bakgrunn av det selektive spaltningsmønsteret kan det tenkes at legumain har en regulatorisk rolle oppstrøms i signalkaskader. Den fysiologiske funksjonen til legumain i pattedyr er forholdsvis lite studert, og er trolig mer omfattende enn det man har klart å kartlegge per i dag. Legumain er vist å være nødvendig for normal nyrefunksjon [62] og er involvert i benresorpsjonen ved at det hemmer osteoklastdannelse [63]. I tillegg spiller legumain en rolle i prosesseringen av antigen for presentering til klasse II "major histocompatibility complex" (MHC) [64]. Økt ekspresjon av legumain er observert ved hjerneslag i rotter [53] og legumain er assosiert med tumormetastasing og -angiogenese [54, 55]. Enzymet er også foreslått å spille en rolle i aterosklerose, og økt ekspresjon på både mRNA- og proteinnivå er observert i ustabile sammenlignet med stabile plakk [65]. Atorvastatin er vist å nedregulere legumain mRNA i monocytter hos pasienter på statinbehandling [12]. Eksempler på endogene inhibitorer av legumain er cystatin C, F og E/M, der sistnevnte er mest potent ( $K_i=0,0016$ ) [66].

Caspasene, som er nøkkelenzymer i apoptosekaskaden i pattedyr, finnes ikke i planter og legumain er vist å fungere som effektorprotease for apoptoseprosessen i planter. Det er foreslått at legumain kan ha evolusjonært slektskap med caspasene da de har sekvenslikheter på aminosyrenivå i både eukaryote organismer og bakterier. Caspasene har i likhet med legumain, spesifisitet for en spesifikk aminosyre (aspartat) i P1-posisjonen på substratet. Legumain er også vist å spalte ved aspartat ved sur pH, men med lavere affinitet enn caspasene. Forklaringen på dette kan være at sur pH medfører protonering av aspartat slik at

den ligner aminosyren asparagin. Hydrolyse ved aspartat er blant annet vist ved at legumain spalter caspase-1-substrater [51, 58, 67]. Videre har legumain og caspasene lik aminosyresekvens i det katalytiske setet ("His-Gly-spacer-Ala-Cys"), samt likheter i proteinfoldingen [51]. I motsetning til den apoptotiske funksjonen legumain har i planter, har legumain vist seg å ha en antiapoptotisk effekt i blastocyster [68]. Den antiapoptotiske effekten er også observert i tumorer, hvor et overuttrykk av legumain ser ut til å beskytte cellene mot apoptose [54, 55]. Mekanismen for den antiapoptotiske effekten av legumain er ikke kjent.

### 1.4.2 Cathepsin B og L

Cathepsin B og L uttrykkes i høye konsentrasjoner i vev med høy grad av proteinomsetning som nyrer, lever, milt og placenta. Selv om skjelettmuskel har lav grad av proteinomsetning, er tilstedeværelsen av cathepsiner demonstrert i flere studier, også i humane skjelettmuskelceller. De enzymatiske egenskapene for cathepsinene er tilsvarende uavhengig av muskeltypen de er observert i. Type I fibre er vist å ha høyere nivå av cathepsiner enn type II fibre, og cathepsinene er lokalisert i myofibrene og mellom myofilamentene [69]. Cathepsinene er hovedsakelig lokalisert i lysosomene, men de finnes også ekstracellulært [70].

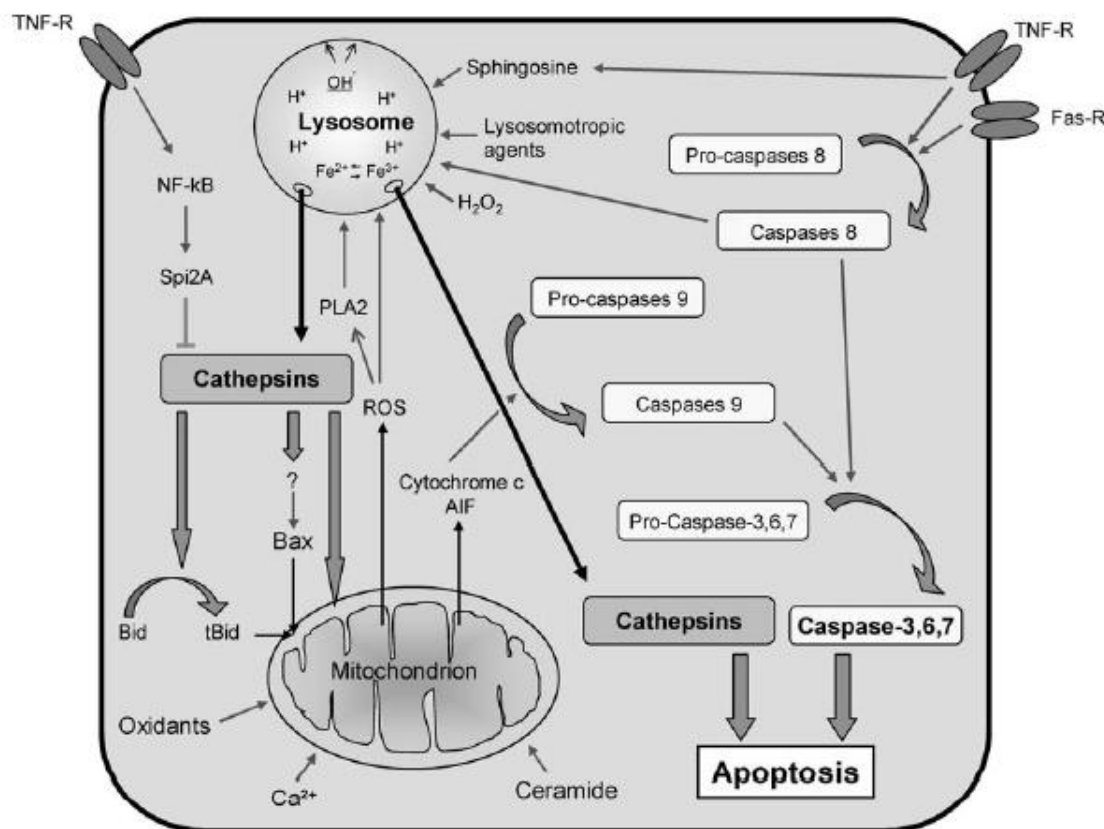
I likhet med legumain syntetiseres cathepsinene som preproenzymer, modifiseres til zymogener og undergår autokatalyse og videre modifisering mediert av andre proteaser. Zymogenet for cathepsin B (procathepsin B), har en molekylvekt på 40 kDa. De to aktive formene av cathepsin B har en molekylvekt på henholdsvis 29 kDa ("single chain") og 25 kDa ("two chain"). Cathepsin B er både en endo- og eksopeptidase, mens cathepsin L er en endopeptidase. Zymogenet for cathepsin L (procathepsin L) har en molekylvekt på 39 kDa, og de to aktive formene har en molekylvekt på henholdsvis 31 kDa ("single chain") og 24 kDa ("two chain") [57, 69, 71]. Betydningen av de to aktive formene av cathepsin B og L er ikke kjent. Legumain er vist å prosessere cathepsinenes "single chain" til "two chain", og legumain "knockout"-mus viste ingen prosessering av "single chain" til "two chain" [52, 60]. Aktiviteten til cathepsinene øker ikke ved prosesseringen mediert av legumain [60]. Både cathepsin B og L er relativt uspesifikke i sitt spaltningsmønster, og utviser ikke samme spesifisitet som legumain. Cathepsin B foretrekker aminosyren arginin i P2-posisjon og en stor hydrofob gruppe i P1'-posisjon i substratsekvensen, mens cathepsin L spalter

peptidsekvenser med en hydrofob aminosyre i P2-posisjon og en polar aminosyre i P1-posisjon [60]. Begge de nevnte cathepsinene har optimal aktivitet ved sur pH [72].

Cathepsin B og L er begge vist å være involvert i patologiske tilstander som kreft og aterosklerose [70, 72]. Cystatin C er den mest potente endogene hemmeren av begge cathepsinene (med  $K_i$  på henholdsvis 0,25 nM og <0,0005 nM), men de hemmes i likhet med legumain av cystatin E/M samt andre cystatiner [50, 72]. Cathepsin B og L er også vist å være involvert i apoptose i flere celletyper. Rollen til cathepsinene og lysosomene i apoptose er forklart nærmere i neste kapittel.

### **1.4.3 Lysosomene og cathepsinenes rolle i apoptose**

Lysosomene er en del av det nedbrytende maskineriet i mammalske celler og bidrar til å opprettholde homeostase. Organellene har en sentral rolle i skjelettmuskelceller, og flere muskelsykdommer karakteriseres av endringer i lysosomale proteiner [73]. Lysosomene er utformet som membranbundne vesikler, hvor lumen har en sur pH på 4-5. Sur pH er nødvendig for hydrolasenes evne til å degradere ulike makromolekyl [69]. Lysosomenes rolle i nekrose og autofagi har lenge vært etablert [74]. De molekylære mekanismene for lysosomale proteasers rolle i apoptose er derimot ikke fullstendig kartlagt, men frisetting av lysosomale proteaser ut i cytosol er vist å trigge intracellulære kaskader og apoptose [49, 74-76]. Hvor stor rolle de lysosomale proteasene spiller i apoptose, om de er initierende eller amplifiserende, og om de inngår i dødsreseptor-signalveien eller den mitokondrielle signalveien varierer i ulike cellemodeller og ved stimulering med ulike apoptoseindusere. Figur 1.3 gir en oversikt over signalveiene i apoptoseprosessen og koblingen til lysosomene.



**Figur 1.3: Oversikt over apoptose-signalveier, og koblingen mellom lysosomene og mitokondriene ved apoptose.** Apoptose kan medieres via to signalveier: dødsreseptor-signalveien og den mitokondrielle signalveien. Dødsreseptorsignalveien initieres ved spesifikk ligandbinding til dødsreseptorer (TNF-R og Fas-R) på celleoverflaten. Dette gir autoaktivering av procaspase-8 og videre aktivering av caspasekaskaden. Den mitokondrielle signalveien aktiveres av intracellulære signaler som gir forandringer i den indre mitokondriemembranen. Dette resulterer i frigjøring av cytokrom c som aktiverer procaspase-9. Aktiv caspase-9 initierer videre den samme caspase-kaskaden som caspase-8. Den lysosomale membranen vil trolig destabiliseres eller permeabiliseres tidlig i apoptoseprosessen av oksidativt stress, og permeabiliteten vil øke ytterligere i løpet av prosessen. Økt permeabilitet gir økt frigiving av lysosomale proteaser som cathepsinene. I cytosol kan cathepsinene angripe mitokondriene direkte samt spalte det proapoptotiske proteinet Bid, og begge hendelser fører til økt mitokondriepermeabilitet. I tillegg kan cathepsinene katalysere proteolytisk nedbrytningen av substrater som er viktig for overlevelse. Store grå piler indikerer proteolytisk spaltning. Figuren er hentet fra [49].

Cathepsin B, D og L er vist å spille en rolle i reguleringen av apoptose i flere celletyper [49, 69, 74-76]. I tillegg regnes cathepsin L for å være en generell markør på muskelatrofi, vist ved overuttrykk av mRNA. Overuttrykk av mRNA for cathepsin B og D er også rapportert ved muskelatrofi av ulike årsaker, men observasjonene av uttrykket er ikke systematisk og er mindre uttalt enn cathepsin L mRNA. "Messenger" RNA-uttrykket kan ikke direkte korreleres til aktiviteten til cathepsinene [69].



Cathepsinene er hovedsakelig lokalisert i lysosomene under fysiologiske forhold, men de kan frigjøres til cytosol ved stimulering eller celledskader [49]. For at cathepsinene skal lekke ut i cytosol må den lysosomale membranen destabiliseres eller permeabiliseres, uten at den fysiologiske rollen til lysosomene og membranen nødvendigvis ødelegges. Det er foreslått flere mekanismer for lysosomal membranpermeabilitet (LMP) og mekanismene varierer mellom ulike celletyper. Faktorer som er vist å destabilisere membranen er lysosomotrope forbindelser (eksempel  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , klorokin, metylamin, bafilomysin A1), oksidativt stress (ROS, som  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), tumor nekrosefaktor alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ) og sphingosiner [74]. Lysosomotrope forbindelser vil akkumulere i lysosomene ved at de protoneres, og destabiliserer membranen ved å virke som surfaktanter. Oksidativt stress kan genereres av både  $\text{TNF}\alpha$  og lipopolysakkarid (LPS). ROS produseres også av mitokondriene ved påvirkning fra lysosomale enzymer, noe som fører til en tilbakevirkende effekt på lysosomene og ytterligere destabilisering. ROS kan i tillegg aktivere fosfolipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ), som destabiliserer den lysosomale membranen ved degradering av fosfolipider [49, 74-76]. Tidligere trodde man at Bax og Bak også translokaliserte til den lysosomale membranen og forårsaket permeabilitet i likhet med mitokondriemembranen, men dette ser ikke ut til å være tilfellet. Bax og Bak er å gjenfinne i inaktive former i lysosomene, trolig som et resultat av autofagi av ødelagte mitokondrier ved apoptose. Apoptosomet, caspase-3, -7 og -9 ser derimot ut til å kunne trigge LMP [74].

Cathepsinene er aktive da de frigjøres fra lysosomene, og promoterer apoptose ved å kløyye proapoptotiske substrater og/eller caspaser [74]. Det er identifisert få apoptosesubstrater for cathepsinene fordi cathepsinene er uspesifikke i sin proteolytiske aktivitet. Det er vanskelig å skille en cathepsineffekt fra andre proteaseeffekter i ulike cellemodeller [77]. Cathepsin B er vist å prosessere Bid og caspase-2 og produserer reaktive oksygenforbindelser (ROS). I likhet med andre cathepsiner degraderer cathepsin B proteinene Bcl-2, Bcl<sub>XL</sub>, Mcl-1, Bak og Bim, som resulterer i økt permeabilitet av mitokondriemembranen og frigjørelse av cytokrom c [49, 74-77]. Cathepsinene er også vist å hemme X-kromosomkoblet hemmer av apoptose (XIAP) [77]. Cathepsin D er vist å mediere aktiveringen av caspase-8 og er involvert i apoptose induisert av staurosporin, p53, oksidativt stress og  $\text{TNF}\alpha$ . Cathepsin D er også vist å kløyye Bax og caspase-8 direkte [49, 74].

## 1.5 Mål for oppgaven

Målet med denne oppgaven er å studere en eventuell sammenheng mellom lysosomale cysteinproteaser og statinindusert myotoksisitet ved å:

- Karakterisere proteinekspressjonen og aktiviteten av de lysosomale cysteinproteasene legumain og cathepsin B i primære humane skjelettmuskelceller under differensieringen fra myoblaster til myotuber.
- Studere effekten av simvastatin på cellelevabilitet av myotuber.
- Studere effekten av simvastatin på ekspresjon (mRNA og protein) og aktivitet av legumain og cathepsin B i myotuber.
- Studere om myotuber fra muskeldonorer med påviste muskelbivirkninger av atorvastatin er mer eller mindre sensitive ved simvastatinstimulering i kultur, enn myotuber fra friske frivillige.
- I tillegg studere effekten av simvastatin på den mitokondrielle respirasjonen i form av opptak og oksidering av glukose.
- Studere om simvastatineffektene på det overnevnte skyldes en hemming av HMG-CoA-reduktase.

## 2 Materialer og metode

### 2.1 Materialer

Dulbecco's Modified Eagle medium med glutamax (DMEM/Glutamax-I), føtalt kalveserum (FCS), penicillin-streptomycin (10000 IE/10 mg/ml), Fungizone® (250 µg/ml amfotericin B), NuPAGE® Antioxidant, NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x), NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) og primere for legumain, cathepsin L, cystatin E/M, 36B4 og GAPDH ble kjøpt fra Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Ultrose G ble anskaffet fra BioSerpa, Process division of CIPHERGEN Biosystems Inc (Paris, Frankrike). Ekstracellulær matriks (ECM) gel, dimetylsulfoksid (DMSO), bovint serum albumin (BSA), dietylpyrokarbonat (DEPC), Tris (base), Ponceau S løsning og ditiotreitol (DTT) ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Insulin Actarapid® Penfil ble innkjøpt fra NovoNordisk (Bangsværd, Danmark). 6-brønners brett Corning® 6 Well Cell Culture Cluster og coatede 6- og 96-brønners brett og 25 cm<sup>2</sup> flasker Corning®CELLbind Surface var kjøpt fra Corning Inc. (Corning, NY, USA). Natriumdihydrogenfosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O), natriumhydroksid (NaOH), natriumklorid (NaCl), metanol (CH<sub>3</sub>OH), aceton (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) og tryptanblått ble anskaffet fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Simvastatinlaktone ble kjøpt fra Toronto Research Chemicals (TRC) (North York, Ontario, Canada). Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate ble innkjøpt fra Biorad Laboratories Inc. (København, Danmark). Albuminstandard, SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Restore™ Western Blot Stripping Buffer ble skaffet fra Thermo Scientific (Rockford, USA). Legumainsubstrat Z-Ala-Ala-Asn-NHMe ble kjøpt fra Department of Biochemistry, University of Cambridge (UK). Cathepsin B-substratet Z-Arg-Arg-AMC ble anskaffet fra Bachem (Bubendorf, Sveits). Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards, Tween® 20 og antistoffene Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate og Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate ble innkjøpt fra Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Fettfri tørrmelk var en gave fra Normilk AS (Levanger, Norge). Goat Anti-Human polyclonal antibody to legumain ble kjøpt fra R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), Rabbit Anti-Human Polyclonal antibody to cathepsin B ble anskaffet fra EMD Millipore (Billerica, MA, USA). Mouse Anti-Human monoclonal antibody to GAPD ble kjøpt fra Santa Cruz Biotechnology Inc (CA, USA). Antistoffet Rabbit Anti-Human monoclonal antibody to β-aktin ble innkjøpt fra Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Rabbit Anti-Goat immunoglobulins/HRP ble anskaffet fra Dakocytomation (Glostrup,

Danmark). Enhanced chemiluminescence reagents (ECL) ble anskaffet fra GE Healthcare (Buckinghamshire, England). Kodak X-Ray fixer, Kodak X-Ray developer og Kodak BIOMAX MS Film ble kjøpt fra Carestream Health, Inc. (Rochester, NY, USA). CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay ble kjøpt fra Promega (Madison, WI, USA). Agilent Total RNA isoleringskit ble kjøpt fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). 96-brønners Isoplate® var fra Wallac OY (Turku, Finland). SYBR green, MicroAmp® Optical Reaction Plate og High-Capacity cDNA Revers Transcription Kit ble kjøpt fra Applied Biosystem (Warrington, UK). Primere for cathepsin B ble anskaffet fra Eurogentec (Seraing, Belgia). D-[<sup>14</sup>C(U)]glukose (5 mCi/mmol) ble kjøpt fra American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA). OptiPhase Supermix, Unfilter®-96 GF/B og TopSeal®-A film var skaffet fra PerkinElmer (Shelton, CT, USA).

Øvrige reagenser benyttet i denne oppgaven var av analytisk kvalitet.

## 2.2 Donorkarakteristika

I celleforsøkene ble det benyttet primære humane skjelettmuskelceller isolert fra muskelbiopsier tatt fra *Musculus obliquus internus abdominis* (skrå, indre bukmuskel) fra friske frivillige nyredonorer og fra *Musculus vastus lateralis* (lårmuskel) fra både friske frivillige og fra pasienter inne til klinisk utredning med påviste muskelbivirkninger av statiner. De respektive muskeldonorene er navngitt LD-donor (levende donor, tabell 2.1), H-donor (human donor, tabell 2.2) og AMD-donor (atorvastatin muskel donor, tabell 2.3) i cellebanken. I resultat- og diskusjonsdelen er disse angitt som henholdsvis buk-donor, lår-donor og syk lår-donor eller ved sin anatomiske lokalisasjon, for lettere å få oversikt over resultatene.

**Tabell 2.1 Donorkarakteristika LD-donor (buk)**

ID	Alder (år)	Kjønn (M/K)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Fastende glukose (mmol/l)	LDL (mmol/L)	HDL (mmol/L)	TG (mmol/L)
LD 5	65	M	22,5	5,1	3,4	1,8	1,0
LD 11	28	M		4,5	3,7	1,6	1,1
LD 22	40	M	28,7	5,0	4,4	1,1	1,5
LD 23	61	K	21,8	4,8	2,4	2,8	0,5
LD 24	70	K	24,2	5,0	3,8	2,5	0,6
LD 25	60	K		7,5	3,7	1,6	1,7
LD 28	48	K	31,8	4,9	2,3	1,1	1,2
LD 30	36	M	26,2	5,0	3,7	1,4	0,9
LD 32	34	K	22,3	5,1	1,7	1,9	0,5
Gj. snitt ± SEM	49,1 ± 5,1		25,4 ± 1,4	5,2 ± 1,7	3,2 ± 1,1	1,8 ± 0,6	1,0 ± 0,3

(Forkortelser: LD = levende donor, BMI = Body mass index, SEM = standardfeil)

**Tabell 2.2 Donorkarakteristika H-donor (frisk, lår)**

ID	Alder (år)	Blodglukose (mM)	Insulin (pmol/l)	Maks glukoseopptak (%) 100-1000 nm insulin	Glykogensyntese (%) 100 nM insulin
H 12.09.00 II	25	4,61	147	161	193
H 22.09.00 II	24	5,04	68	192	186
H 25.09.00 I	37	5,71	97	268	239
Gj. snitt ± SEM	28,6 ± 4,2	5,1 ± 0,3	104 ± 23,1	207,0 ± 31,8	206,0 ± 16,6

(Forkortelser: H = human donor, SEM = standardfeil)

**Tabell 2.3 Donorkarakteristika AMD-donor (syk, lår)**

AMD	Alder (år)	M/K	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Sykdom	Muskel-biopsi	Beskrivelse av bivirkninger	Lipid-senkende behandling	Andre legemidler
2	64	K	36,5	Hypertyreose, gonartrose, dyp venetrombose	Normal	Muskelsmerter	atorvastatin, ezetimib	acetyl-salicylsyre, ibesartan, levothyroxin
3	56	M	30,7	Søvnapné	Normal	Smerter og stivhet i muskel og ledd, hodepine, tretthet, utmattelse	omega-3, ezetimib, colessevelam, simvastatin, atorvastatin, pravastatin, fluvastatin	acetyl-salicylsyre, mometason
5	63	M	23,5	Borreliose, muskel-plager	Atrofi	Smerter og stivhet i hele kroppen	pravastatin, atorvastatin, ezetimib	nifedipin, diclofenac, paracetamol + kodein
6	45	M	27,3	Mitokondriopati	Normal	Muskelsmerter ved fysisk anstrengelse	atorvastatin	clonazepam, beklo-metason
Gj. snitt. ± SEM	57,0 ± 4,4		29,5 ± 2,8					

(Forkortelser: AMD = atorvastatin muskeldonor, M = Mann, K = Kvinne, BMI = Body mass index, SEM = standardfeil)

## 2.3 Celledyrking

Metoden som er benyttet under celledyrking er utført i henhold til prosedyren som er utarbeidet av Gaster et al. [78, 79]. Celledyrkingsprosessen inkludert stimulering tok totalt fra 14 til 15 dager.

### 2.3.1 Utsåing av satelittceller

Ampuller med nedfrosne satelittceller i dimetylsulfoksid (10 % DMSO) ble tint raskt på vannbad og cellesuspensjonen ble overført til et 50 ml sentrifugerør. Utsåingsmedium (5 ml, Appendiks 1.1) ble tilsatt dråpevis for å fortynne effektene av cytotoxisk DMSO. Røret ble sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter, supernatanten ble sugd av og cellepelleten resuspendert i 1 ml utsåingsmedium. Celletettheten ble beregnet ved å ta ut 10 µl av henholdsvis cellesuspensjonen og 0,4 % tryptanblått (1:1) til et eppendorfrør, før avlesning i automatisk celledetektor (Countess™). Ut fra antall levende celler/ml ble mengde cellesuspensjon og utsåingsmedium beregnet. For forsøkene der enzymaktiviteten, ekspresjonen og sekresjonen ble målt, ble et utsåingsvolum på 2 ml med 50 000 celler tilsatt ubehandlede og ferdigcoatede 6-brønnersbrett (Corning® 6 Well Cell Culture Cluster, Corning® CELLbind Surface). Ubehandlete brett ble på forhånd coatet med ekstracellulær matriks (ECM, Appendiks 1.2). For viabilitet- og oksidasjonsforsøkene ble et utsåingsvolum på 100-150 µl med 6000 celler sådd ut på ferdigcoatede 96-brønnersbrett (Corning® CELLbind Surface). Cellene benyttet i RT-real-time PCR forsøket ble sådd ut i coatede 25 cm<sup>2</sup> flasker (Corning® CELLbind Surface) med et utsåingsvolum på 4 ml og 50 000 celler. Etter utsåing ble brettene inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.3.2 Proliferasjon og differensiering av myoblaster til myotuber

Etter 24 timer ble utsåingsmediumet byttet til proliferasjonsmedium (Appendiks 1.3). Proliferasjonsmediumet ble skiftet hver 2.-3. dag til cellene nådde 70-80 % konfluens eller til myotubene startet å spontandifferensiere. Deretter ble cellene tilsatt differensieringsmedium (Appendiks 1.4). Differensieringsmediumet ble byttet på dag 2 og 5 i differensieringsperioden og stimuleringsmedium ble tilsatt på dag 5 eller 6.

### 2.3.3 Stimulering med simvastatin og mevalonat

Stockløsninger av simvastatinlaktone (100 mM) og mevalonolaktone (2 mM) løst i DMSO ble fortynnet videre i DMSO og/eller differensieringsmedium til stimuleringsforsøkene. Konsentrasjonen av DMSO i mediet var alltid 0,1 %, da dette ikke er toksisk for cellene. For at løsemiddelet ikke skulle interferere med resultatene, ble kontrollcellene behandlet med differensieringsmedium som også inneholdt 0,1 % DMSO. Simvastatinlaktone og mevalonolaktone er videre referert til som simvastatin og mevalonat. Simvastatin ble tilsatt i konsentrasjonene 1, 5, 10, 20, 25, 30, 40 og 50  $\mu\text{M}$ , og mevalonat i konsentrasjonene 50 eller 1000  $\mu\text{M}$ .

### 2.3.4 Høsting av myotuber

For forsøkene der hensikten var å karakterisere proteasene under differensieringen av myoblaste til myotuber, ble cellene høstet på dag 0, 2, 5 og 7 under differensieringsperioden. For stimuleringsforsøkene med simvastatin med eller uten mevalonat, ble cellene høstet på dag 7 av differensieringsperioden. Ved høsting ble det kondisjonerte differensieringsmediumet sugd av og overført til eppendorfrør. Cellene ble vasket med 1 x PBS (Appendiks 1.5), lysert med 500  $\mu\text{l}$  lysisbuffer (Appendiks 1.6) og løsnet fra brønnoverflaten ved hjelp av en skrape. Cellelysaten ble overført til eppendorfrør og frysetint ved henholdsvis  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  og  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3 ganger. Både det kondisjonerte mediet og lysatene ble deretter sentrifugert ved 10 000 g i 5 minutter ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatanten ble overført til nye eppendorfrør og oppbevart ved  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  før analyse.

## 2.4 Totalproteinmåling

Totalproteinmåling ble utført i henhold til prosedyren beskrevet av Bradford [80]. Målingen ble utført på cellelysaten for å kunne korrigere enzymaktiviteten for proteinmengden og for å kunne beregne mengde cellelysate til oppkonsentrering og applisering på gel ved immunoblotting. For å kunne detektere totalproteinmengden ble reagenset "Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate" benyttet. Dette reagenset inneholder fargestoffet "Coomassie® Brilliant Blue G-250" som bindes til proteiner i surt miljø. Proteinbindingen medfører en fargeendring fra rødbrunt til blått, og dermed en endring i absorpsjonsmaksimum fra 465 til 595 nm.

Bovint serumalbumin fortynnet i lysisbuffer ble benyttet som standard i konsentrasjoner fra 0 til 300 µg/ml. Standardkurven ble benyttet til å beregne proteinkonsentrasjonene i cellelysaten. Ti µl av både standard og cellelysate ble tilsatt som duplikater i Nunc 96-brønners mikrotitrerplate. Deretter ble brønnene tilsatt 200 µl fortynnet fargereagens (Appendiks 2.1), og inkubert 5 minutter i mikroplateleseren (Wallac 1420 Victor<sup>3</sup> Multilabel counter) ved 30 °C. Absorbansen ble så målt ved 595 nm.

## 2.5 Enzymaktivitetsmåling

Målingen av legumainaktivitet ble utført i henhold til prosedyrene beskrevet i Chen et al. [52] og Johansen et al. [81]. Tilsvarende ble cathepsin B-aktivitet målt som beskrevet av Barrett et al. [82]. For å kunne måle enzymaktiviteten må cysteinproteasene aktiveres, og det syntetiske reduksjonsmidlet DTT (ditiotreitol) ble benyttet i denne oppgaven [52]. I tillegg ble det benyttet spesifikke peptidsubstrater med fluorescerende "leaving"-grupper. Peptidsubstratet benyttet for legumain var Z-Ala-Ala-Asn-NHMec (brønnskonsentrasjon 10 µM), og for cathepsin B Z-Arg-Arg-AMC (brønnskonsentrasjon 20 µM). "Leaving"-gruppene NH<sub>2</sub>Mec og AMC angir begge samme kjemiske stoff (7-amino-4-metylkumarin) og avgir kraftig fluorescens ved 360 nm eksitasjon og 460 nm emisjon.

Triplikater av 20 µl cellelysate ble tilsatt en svart Costar 96-brønners mikrotitrerplate og platen ble plassert i mikroplateleseren (Wallac 1420 Victor<sup>3</sup> Multilabel counter). Lysisbuffer ble benyttet som blindprøve. "Assaybuffer" (100 µl) med DTT (Appendiks 3.1 og 3.3) ble tilsatt ved hjelp av en injektor, platen ble så ristet i 10 sekunder og inkubert i 10 minutter ved 30 °C. Deretter ble 50 µl substratløsning (Appendiks 3.2 og 3.4) tilsatt, og fluorescens ble målt kinetisk 10 ganger i løpet av 30 minutter. Endringen i fluorescens (ΔF/s) ble deretter beregnet. Tilsetningen av assaybuffer og substrat ble også foretatt manuelt i perioder da injektorsystemet var ute av drift.

## 2.6 Immunoblotting (Western blotting)

Ved immunoblotting detekteres og kvantifiseres spesifikke proteiner ved hjelp av antistoffer etter separering ved gelelektroforese.

Proteinmålingene som tidligere er beskrevet i kapittel 2.5, ble benyttet for å beregne uttaket av cellelysaten for å kunne applisere 12 µg totalprotein på gelen. Ved lavt proteininnhold i



lysaten ble 6 eller 3 µg applisert og senere korrigert for etter kvantifisering. Lysatet ble oppkonsentrert ved acetonefelling (Appendiks 8), og deretter reløst i blant annet "NuPAGE® LDS Sample Buffer" og DTT (Appendiks 4.1) før koking. Bufferen og koking denaturer proteinene og gir proteinene en uniform negativ ladning. DTT bidrar til ytterligere denaturering ved å bryte disulfidbindingene som bidrar til den tredimensjonale strukturen til proteinene. Prøvene, proteinstandard og rekombinant prolegumain ble deretter applisert på en polyakrylamid gel (4-12 % Bis-Tris gel) som på forhånd var plassert i et elektroforesekar tilsatt elektroforesebuffer (Appendiks 4.3). Elektroforesen og separeringen av proteinene etter molekylvekt ble utført ved 200 V i 50 minutter. Videre ble proteinene på gelen overført til en nitrocellulosemembran ved hjelp av en blottebuffer (Appendiks 4.4) og 32 mA strøm per gel i 60-90 minutter. Membranen ble deretter blokket med Blotto (Appendiks 4.5) for å unngå uspesifikk binding av antistoff til membranen. Membranen ble inkubert med primærantistoff over natt ved 4 °C og inkubert 1 time med sekundærantistoff den påfølgende dagen. Primærantistoffet er spesifikt for det proteinet man ønsker å detektere, og det sekundære antistoffet bindes spesifikt til det primære (tabell 2.4 for antistoffene som er benyttet). Enzymet "Horseradish Peroxidase" (HRP) er konjugert til det sekundære antistoffet, og danner et lysende kompleks ved tilsetning av enten "Enhanced chemiluminescence" (ECL)-reagens eller "SuperSignal @West Dura Extended Duration Substrate"-reagens. Lyset ble detektert ved hjelp av eksponering på film og manuell fremkalling i mørkerom eller ved ChemiDoc™ XRS+. Ved manuell fremkalling ble membran eksponert på film, og filmen ble inkubert i fremkallerløsning og fiksert i fikserløsning (Appendiks 4.6 og 4.7). Størrelsen på og tilstedeværelsen av proteinene ble verifisert ved å sammenlikne båndene med molekylvektene til applisert proteinstandard og båndet for rekombinant prolegumain.

Membranene ble strippet og tilsatt nytt primær- og sekundærantistoff, slik at både legumain, cathepsin B og "housekeeping"-kontroller (GAPDH eller β-aktin) kunne detekteres innad i samme forsøk. Programmet Image Lab™ ble benyttet for å kvantifisere båndvolumene, og proteaseekspresjonen ble korrigert for "house-keeping"-kontrollen, og deretter fremstilt relativt til kontroll.

**Tabell 2.4 Antistoffer benyttet ved immunoblotting**

Protein	Primærantistoff	Fortynning	Sekundæantistoff	Fortynning
Legumain	Goat Anti-Human polyclonal antibody to legumain	1:1000	Rabbit Anti-Goat immunoglobulins/HRP	1:5000
Cathepsin B	Rabbit Anti-Human Polyclonal antibody to cathepsin B (anti-sera)	1:4000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:3000
GAPDH	Mouse Anti-Human monoclonal antibody to GAPDH	1:500 1:1000 1:10 000	Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:1500
$\beta$ -aktin	Rabbit Anti-Human monoklonal antibody to $\beta$ -Actin	1:1000	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	1:3000

## 2.7 Celleviabilitetsmåling (MTS)

Celleviabiliteten ble målt ved hjelp av "Cell Titer 96 <sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay", og produsentens protokoll ble fulgt. Assayet inneholder tetrazoliumforbindelsen MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium) og det elektronbindende reagenset PES (fenazine etosulfat). Dehydrogenaseenzymer i metabolsk aktive celler produserer NADPH og NADH som reduserer MTS-reagenset til formazan. Formazan er et rødbrunt produkt som kan detekteres ved absorbansmåling ved 490 nm, og mengden som dannes vil være direkte proporsjonal med antall levende celler.

MTS-reagenset (20  $\mu$ l) ble tilsatt direkte i cellemediet i 96-brønnersbrettet, 48 timer etter stimulering med simvastatin med eller uten mevalonat. Hver prøve forelå i triplikater. Mengden formazan som ble dannet ble målt ved tiden 0, 30 minutter og deretter hver time til totalt 4 timer etter tilsetning i mikroplateleseren (Wallac 1420 Victor<sup>3</sup> Multilabel counter). Brettet ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> mellom hver måling. Blindprøver bestående av differensieringsmediet med og uten 0,1 % DMSO ble også målt for å kontrollere at dette ikke skulle interferere med resultatet. Resultatene etter 2 timers inkubering ble fremstilt da det for dette tidspunktet var størst forskjell mellom kontrollen og de ulike simvastatinkonsentrasjonene med og uten mevalonat.

## 2.8 “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA)

”Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) er en immunologisk metode som kan detektere og kvantifisere proteiner ved bruk av spesifikke primær- og sekundærantistoff og måling av optisk tetthet. Totalmengden av Legumain (aktiv og proform) ble detektert ved hjelp av ”Human Total legumain DuoSet” (DY 4769, R&D systems)-kit, og leverandørens protokoll ble fulgt. En 96-brønners mikrotitrerplate ble ”coatet” med primærantistoff (”Capture Antibody”) og inkubert over natt. Det spesifikke primærantistoffet vil binde legumain som befinner seg i det kondisjonerte mediet. Påfølgende dag ble brønnene vasket med vaskebuffer (Appendiks 5.1), tilsatt 300 µl ”Reagent dilution” (RD) for deretter å bli vasket på nytt. Standarder og medieprøvene ble fortynnet i RD-løsningen, og tilsatt i duplikater på 100 µl på mikrotitrerplaten. Etter inkubering i 2 timer og etterfølgende vasking, ble 100 µl sekundærantistoff (”Detection Antibody”) fortynnet i RD tilsatt. Det sekundære antistoffet er konjugert med biotin og binder til en annen epitop på legumain. Etter ny inkubering på 2 timer og vasking, ble 100 µl av enzymet streptavidin-HRP (”Horseradish Peroxidase”) tilsatt. Streptavidin-HRP binder til biotin på det sekundære antistoffet. Brønnene ble deretter vasket og det ble tilsatt 100 µl substratløsning. Substratet vil gi en fargereaksjon med HRP, og den optiske tettheten i løsningen forandres. For å stoppe reaksjonen ble 50 µl stoppløsning tilsatt etter 20 minutter, og absorbansen ved 450 nm ble avlest umiddelbart i mikroplateleseren (Wallac 1420 Victor<sup>3</sup> Multilabel counter).

## 2.9 Revers-transkripsjon-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real-time-PCR)

Metoden revers-transkripsjon-real-time-polymerase-kjedereaksjon (RT-real-time-PCR) benyttes for å kvantifisere endringer av ”messenger”-RNA (mRNA) uttrykk. I denne oppgaven ble RT-real-time-PCR benyttet for å undersøke om simvastatin påvirker mRNA-uttrykket av legumain, cathepsin B, cathepsin L og cystatin E/M i humane myotuber. Det ble sådd ut 250 000-300 000 celler i 25 cm<sup>2</sup> flasker, og cellene ble stimulert med simvastatin på dag 5 i differensieringsperioden. Videre ble cellene vasket 2 ganger med PBS i DEPC-H<sub>2</sub>O etter 48 timer, og lysert med 600 µl lysisbuffer fra Agilent. Deretter ble cellene løsnet fra bunnen av flaskene ved hjelp av en skrape og overført til autoklaverte eppendorfrør og oppbevart på is til RNA-isolering.

### **2.9.1 Isolering og kvantifisering av RNA**

Protokoll og utstyr (nukleasefritt vann, vaskeløsning, lysisbuffer og minikolonner) fra "Agilent Total RNA Isolation Mini Kit" ble benyttet for RNA-isolering. Kort beskrevet ble cellelysatsen (600 µl) overført til mini-prefiltreringskolonner og sentrifugert ved 16 000 g i 3 minutter. Deretter ble en like stor mengde 70 % etanol tilsatt filtratet og inkubert i 5 minutter. Blandingen ble videre overført til mini-isolasjonskolonnen, og sentrifugert i 30 sekunder ved 16 000 g. Filtratet ble kastet og kolonnen ble tilsatt 500 µl vaskeløsning og sentrifugert i nye 30 sekunder ved 16 000 g. Vaskingen ble gjentatt enda en gang og filtratet ble kastet. Kolonnen ble deretter sentrifugert i 2 minutter ved 16 000 g. Renset RNA ble eluert med 15 µl nukleasefritt vann og sentrifugering i 1 minutt ved 16 000 g.

RNA-mengden i eluatet ble kvantifisert ved hjelp av spektrofotometret "Picodrop microliter UV/Vis" og måling av optisk tetthet (OD). Det ble brukt 2,5 µl av eluatet til kvantifiseringen, og OD-målingene ble utført ved 230-850 nm, og konsentrasjonsberegningen av RNA ble basert på OD-målingen ved 260 nm. I tillegg ble kvaliteten på RNA-et målt ved ratioen mellom 260/280 nm og en ratio over 1,8 ble ansett som god kvalitet. Utbyttet lå på ca. 41-576 µg total-RNA pr celleflaske avhengig av simvastatinkonsentrasjonen cellene var behandlet med.

### **2.9.2 Komplementært DNA (cDNA)-syntese**

Komplementær DNA (cDNA)-syntesen ble utført etter protokoll fra "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for 200 Reactions". Kort beskrevet ble 2 µg total-RNA fortynnet med DEPC-H<sub>2</sub>O til totalt 13,2 µl og overført til mini-ependorfrør (MicroAmp®). Reaksjonsmedium for cDNA-syntese (6,8 µl, Appendix 6.1) ble tilsatt, og cDNA-syntesen ble utført av Thermal Cycler 9600 Perkin-Elmer. Her ble prøvene, blank kontroll og kontrollprøve uten revers transkriptase eksponert for 25 °C i 10 minutter (heksamer i templat-priming), deretter 37 °C i 80 minutter (revers transkripsjon) og til slutt 85 °C i 5 sekunder (inaktivering av revers transkriptase).

### **2.9.3 Real-time PCR**

Amplifisert cDNA ble beregnet i de ulike prøvene ved å lage en standardrekke for hvert av genene. Standardene ble laget ved å blande lik mengde av alle cDNA-prøvene og fortynne 1:5 i DEPC-H<sub>2</sub>O. Videre ble blandingen fortynnet i DEPC-H<sub>2</sub>O til konsentrasjonene 1000, 500,

250, 125, 62,5 og 31,25. Komplementær DNA (cDNA)-prøvene for kvantifisering av legumain, cathepsin B, cathepsin L og cystatin E/M ble fortynnet 1:5 i DEPC-H<sub>2</sub>O, og prøvene for "housekeeping"-kontrollene 36B4 og GAPDH ble fortynnet 1:10 på grunn av høy ekspresjon. Deretter ble 2,5 µl av standardene, prøvene og negativ kontroll applisert på en MicroAmp® Optical Reaction Plate. En reaksjonsblanding bestående av 2 x SYBR Green Master mix, "forward"-primer, "reverse"-primer (tabell 2.5) og DEPC-H<sub>2</sub>O ble tilsatt brønnene (Appendiks 6.2). Platen ble plassert i ABI PRISM 7000 Applied Biosystem. Her ble prøvene behandlet med 40 sykluser, hvor hver syklus består av først 95 °C i 15 sekunder (denatureringsfase), deretter 60°C i 60 sekunder (hybridiseringsfase) og tilslutt 72 °C (polymeriseringsfase). I denatureringsfasen separeres DNA-trådene til ssDNA ("singel stranded" DNA). Videre binder primere seg til den komplementære sekvensen i ssDNAet i hybridiseringsfasen. I polymeriseringsfasen amplifiseres DNAet eksponentielt (2<sup>n</sup>) ved at DNA-polymerase syntetiserer komplementært DNA (cDNA) på de to eksisterende DNA-trådene. Det fluorescerende reagenset SYBR Green bindes til dobbeltrådet DNA som har blitt dannet og fluorescensen detekteres etter hver syklus. CT ("cycle threshold")-verdien representerer når fluorescensen oppstår (den minste detekterbare grensen), og den fluorescerende intensiteten er proporsjonal med mengden cDNA i prøven. CT-verdien blir lavere jo mer mRNA det er i prøven. Ut fra CT-verdien og standardkurven ble n i den eksponentielle funksjonen 2<sup>n</sup> beregnet. "Messenger"-RNA-ekspresjonen av proteasene/-inhibitoren ble deretter relatert til "housekeeping"-kontrollene 36B4 og GAPDH, og oppgitt relativt mot kontroll.

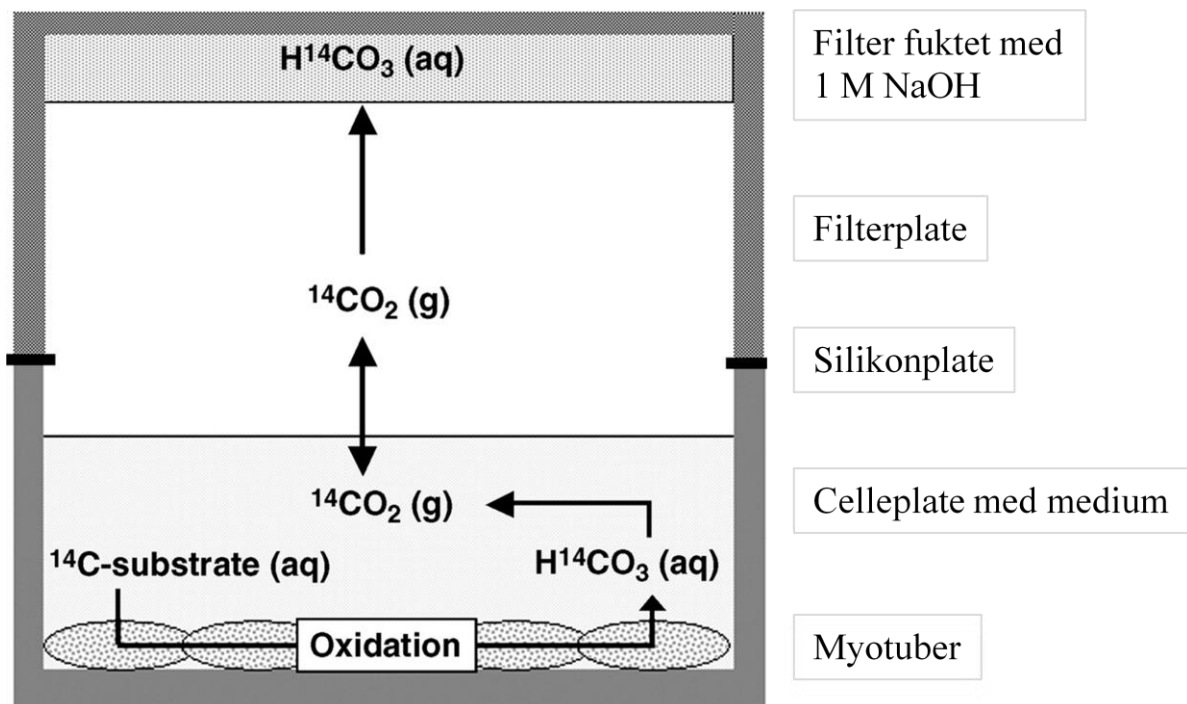
**Tabell 2.5 Primere som ble benyttet ved real-time PCR**

Protein	Gen	Genbanknr.	Primer
Legumain	hLGMN	BC_003061	F 5'-CCGAAAGATGGTGGTCTACATTGA-3' R 5'-TTATCCGGCAGGTGGTTCAT-3'
Cathepsin B	hCTSB	L_16510	F 5'-TTCTGGTGGCCTCTATGAATCC-3' R 5'-CGTTGACGTGGTGCTCACA-3'
Cathepsin L	hCTSL	NP_001903	F 5'-ATGAATCCTACACTCATCCTTGCTGCCTTT-3' R 5'-CCACACTGCTCTCCTCCATCCTTCTT-3'
Cystatin E/M	hCST6		F 5'-GTACTTCCTGACGATGGAGATG-3' R 5'-TAGGAGCTGAGAGGAGGAGTTCTG-3'
36B4	h36B4	M_33197	F 5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' R 5'-AGCAAGTGGAAGGTGTAATCC-3'
GAPDH	hGAPDH	J_04038	F 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' R 5'-GGCATGGACTGTGGTCATAG-3'

Forkortelser: 36B4 = "Human acidic ribosomal phosphoprotein PO", GAPDH = glycerinaldehyd-3 fosfatdehydrogenase, F = "forward"-primer, R = "reverse"-primer.

## 2.10 Substrat-oksidasjonsmetoden

Substrat-oksidasjonsmetoden er utført i henhold til prosedyren som er beskrevet og utarbeidet av Wensaas et al. [83]. Metoden gjør det mulig å kvantifisere oksidasjon ( $\text{CO}_2$ ) og celleassosiert opptak (CA) av radioaktiv [ $^{14}\text{C}$ ]glukose i humane myotuber. Den radiomerkede glukosen tas opp av cellene og blir videre forbrent via glykolysen og Krebszyklus til avfallsproduktet [ $^{14}\text{C}$ ] $\text{O}_2$  (g) (figur 2.1). Produksjonen av radiomerket  $\text{CO}_2$  fanges opp av en filterplate hvor det reagerer med NaOH til  $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_2^-$  (aq). FCCP (karbonylcyanid p-trifluorometoksyfenyl hydrason) benyttes som kontrollsubstans for å kunne måle endringen i den mitokondrielle respirasjonen etter stimulering med simvastatin med og uten mevalonat. FCCP inhiberer koblingen mellom elektrontransportkjeden og fosforyleringsreaksjoner og hemmer dermed ATP-produksjonen og gir et mål på maksimal oksidasjonskapasitet. Differansen mellom FCCP og basal (uten FCCP) utgjør reservekapasiteten til cellene. Kvantifisering estimeres ut fra akkumuleringen av  $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$  i filterplaten (oksidasjon), og mengden radiomerket [ $^{14}\text{C}$ ]-glukose og intermediærprodukter som befinner seg i cellene (celleassosiert radioaktivitet).



**Figur 2.1 Prinsippet bak substrat-oksidasjonsmetoden.** Radiomerket [ $^{14}\text{C}$ ]glukose tas opp i cellen, oksideres og [ $^{14}\text{C}$ ] $\text{O}_2$  (g) dannes. [ $^{14}\text{C}$ ] $\text{O}_2$  (g) diffunderer opp i filterplaten hvor det reagerer med NaOH og danner  $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_2^-$  i filterløsning. Modifisert fra [83].

På dag 5 ble cellene tilsatt differensieringsmedium med simvastatin med eller uten mevalonat. På dag 7 ble cellene vasket med 1xPBS og tilsatt akuttmedium med [ $^{14}\text{C}$ ]glukose (1  $\mu\text{Ci/ml}$ , 200  $\mu\text{M}$ )  $\pm$  1  $\mu\text{M}$  FCCP (Appendiks 7.2 og 7.3). Celleplaten ble deretter dekket med en 96-brønners filterplate (Unfilter®-96 GF/B®). En silikonplate ble lagt mellom celleplaten og filterplaten for å hindre lekkasje av [ $^{14}\text{C}$ ]O<sub>2</sub>. Filterplaten var på forhånd fuktet med 1 M NaOH (20  $\mu\text{l}$  per brønn). Det lufttette systemet nettopp beskrevet, ble presset sammen med en platepresser (CO<sub>2</sub> trapper) og inkubert i 4 timer ved 37 °C. Etter inkuberingen ble filterplaten separert fra cellebrettet og tilsatt 40  $\mu\text{l}$  Optiphas Supermix® til hver brønn. Filterplaten ble så forseglet med TopSeal®-A og radioaktiviteten ("counts per minute") ble målt etter 48 timer ved hjelp av Microbeta® Plus. Akuttmediet fra celleplaten ble fjernet og de levende cellene ble vasket 2 ganger med 150  $\mu\text{l}$  1xPBS-buffer. Cellene ble deretter lysert med 200  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH og frosset over natt ved - 20 °C. Påfølgende dag ble 50  $\mu\text{l}$  cellelysat overført til en ny 96-brønnersplate (Isoplate®), tilsatt 200  $\mu\text{l}$  Optiphas Supermix® og forseglet (TopSeal®-A). Radioaktiviteten ble kvantifisert ved hjelp av Microbeta® Plus.

Kvantifiseringen av totalprotein ble foretatt som tidligere beskrevet i avsnitt 2.5. Cellelysat (50  $\mu\text{l}$ ) og standard ble tilsatt en 96-brønners mikrotitrerplate. Standarden bestod av bovint serumalbumin (konsentrasjoner på 0, 10, 20, 40, 80 og 160  $\mu\text{g/ml}$ ) løst i 0,1 M NaOH.

Substrat-oksidasjonsforsøkene gir et mål på oksidasjon (CO<sub>2</sub>) og celleassosiert opptak (CA) av radiomerket glukose. Ut fra dette ble det totale opptaket (CO<sub>2</sub> + CA) beregnet, som sier noe om mengden [ $^{14}\text{C}$ ]glukose som har vært tatt opp av cellene. Fraksjonell oksidasjon (CO<sub>2</sub>/CA + CO<sub>2</sub>) ble også beregnet, og sier noe om fraksjonen [ $^{14}\text{C}$ ]glukose som er oksidert i forhold til mengden [ $^{14}\text{C}$ ]glukose som er tatt opp i cellene.

## 2.11 Statistiske analyser

Dataene i oppgaven er presentert som enten gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil (SEM) eller relative gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil sammenlignet med kontroll. Gjennomsnittsverdiene er beregnet fra 2 til 3 paralleller avhengig av metode og er tilnærmet lik medianverdiene. Dette tyder på at observasjonene er normalfordelte, og dette antas videre i oppgaven. Antall forsøk (n) varierer fra 1-4. De statistiske analysene ble utført ved hjelp av GraphPad Prism 5 for Windows og signifikansnivået er definert som 0,05 ( $\alpha < 0,05$ ).

Lineær regresjonsanalyse ble benyttet for å studere endringen i enzymaktivitet med økende konsentrasjoner av simvastatin med eller uten mevalonat, da sammenhengen mellom variablene var tilnærmet lineær. Nullhypotesen om ingen endring i sammenhengen mellom variablene ( $H_0; \mu = 0$ ) ble testet mot alternativhypotesen at det foreligger en endring mellom variablene ( $H_a; \mu \neq 0$ ). Simvastatinkonsentrasjonen som hemmer 50 % av enzymaktiviteten ( $IC_{50}$ ) ble også beregnet fra de samme observasjonene.

To-utvalgs t-test (uparet t-test) ble benyttet for å undersøke om endringen i enzymaktivitet og -ekspresjon var statistisk signifikant mellom differensieringsdagene og simvastatinkonsentrasjonene med og uten mevalonat. To-utvalgs t-test ble også benyttet for å undersøke signifikansen mellom ulike behandlinger i celleviabilitetsforsøken, og mellom de ulike donortypene i aktivitetsforsøkene.

Ved oksidasjonsforsøkene er 1-veis-ANOVA benyttet for å sammenlikne endringen i glukoseoksidering og -opptak ved økende konsentrasjoner av simvastatin med og uten mevalonat sammenlignet med kontroll. Forskjellen mellom maksimal oksidasjons- og opptakskapasitet og basalnivå, ble undersøkt ved 2-veis-ANOVA. For å unngå sannsynligheten for falske positive funn, ble Bonferroni-korreksjon benyttet.



## 3 Resultater

### 3.1 Legumain og cathepsin B ekspresjon og aktivitet i primære humane skjelettmuskelceller

Uttrykk og aktivitet av legumain i human skjelettmuskel er ikke tidligere studert. For å kunne studere om legumain er involvert i statinindusert myotoksisitet, ble derfor enzymets basalekspresjon og -aktivitet karakterisert i humane skjelettmuskelceller i kultur. Cathepsin B, som er en annen lysosomal cysteinprotease og også et substrat for legumain, er tidligere karakterisert i skjelettmuskel [69], og ble derfor studert og sammenlignet med legumain.

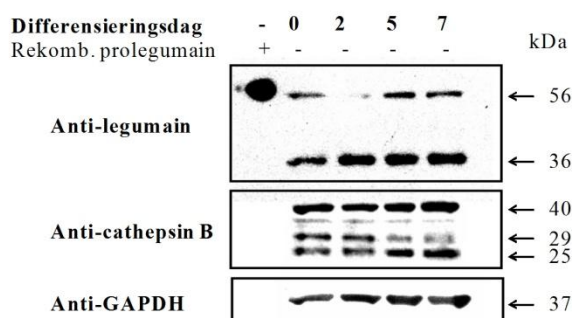
Cellene som ble benyttet var isolerte satelittceller fra bukmuskel (*M. obliquus internus abdominis*). Cellene ble studert under differensieringen av myoblaster (dag 0) til myotuber (dag 5-7) og høstet på dag 0, 2, 5 og 7 etter start av differensieringen.

Immunoblotting av cellelysat fra de ulike tidspunktene viste tydelig tilstedeværelse av både prolegumain (56 kDa) og aktiv form av legumain (36 kDa) under hele differensieringsperioden (figur 3.1 A). Størrelsen på og tilstedeværelsen av legumain ble verifisert ved å sammenlikne legumainbåndene med molekylvektene til applisert proteinstandard og båndet for rekombinant prolegumain. Blottet ga et inntrykk av økt prosessering av prolegumain til aktiv form i løpet av differensieringsperioden, men ved sammenligning med GAPDH som ble brukt som "housekeeping"-kontroll (figur 3.1 A) og kvantifisering av proteinbåndene, så var det ingen signifikant økning i ekspresjonen av aktiv form i forhold til proformen av proteasen (figur 3.1 B).

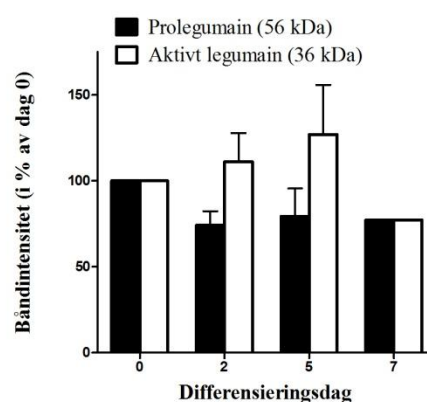
Uttrykket av cathepsin B ble også undersøkt under celledifferensieringen, og immunoblottet viste også her tilstedeværelse av både proformen (40 kDa) og de to aktive formene (29 kDa og 25 kDa) (figur 3.1 A). Kvantifiseringen av proteinbåndene viste et relativt jevnt uttrykk av procathepsin B (40 kDa) og en økende prosessering av aktiv 29 kDa til aktiv 25 kDa (figur 3.1 C). Det svake båndet som er synlig under proformen antas å være rester av GAPDH, da reprobingen med cathepsin B ble foretatt etter GAPDH-probing og stripping av membranen. Molekylvekten til GAPDH (37 kDa) stemmer også godt overens med dette.

Det ble observert en svak, men ikke statistisk signifikant økning i enzymaktivitet for begge proteasene under differensieringsperioden fra dag -2 til dag 7 (figur 3.1 D).

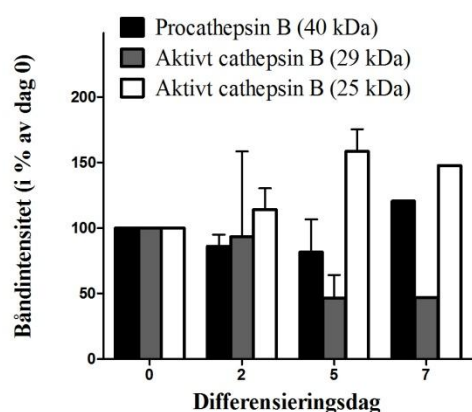
A



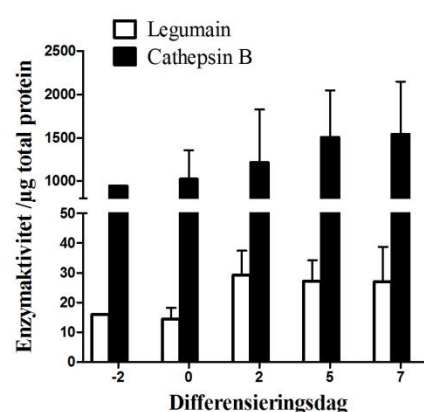
B



C



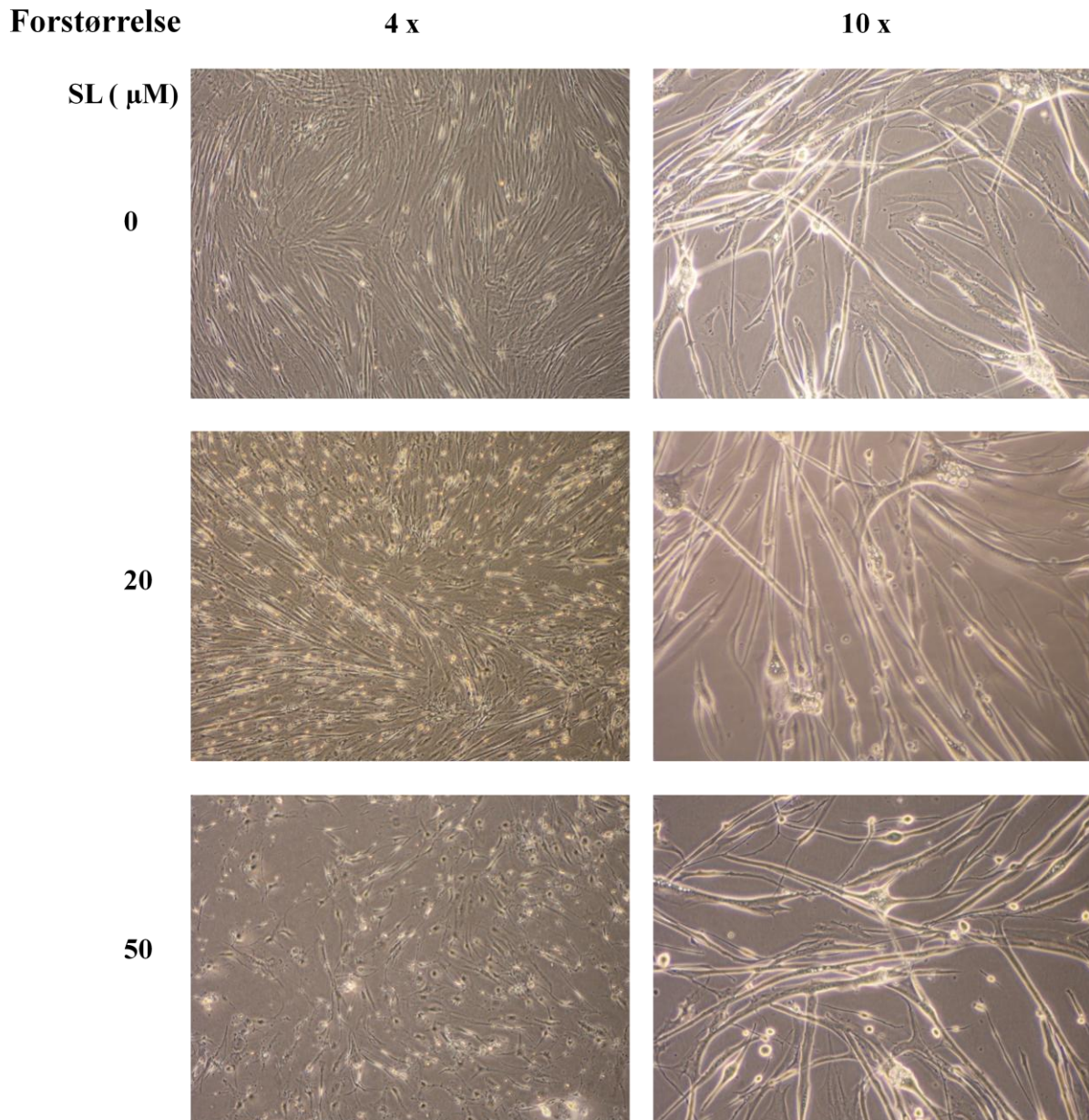
D



**Figur 3.1. Karakterisering av legumain og cathepsin B ekspresjon (A, B og C) og aktivitet (D) under differensiering av humane myotuber.** Primære humane skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis* ble høstet på dag 0, 2, 5 og 7 under differensieringen. Proteinekspressjonen ble undersøkt ved elektroforese og immunoblotting. Cellelysaterne ble oppkonsentrert ved acetone-felling og 12 µg totalprotein ble applisert i hver brønn. Blottene ble analysert ved hjelp av spesifikke antistoffer (A; representativt blott, n=3). Legumain og cathepsin B ekspresjonen ble kvantifisert ved å relatere signalintensiteten for proteasene til GAPDH ("housekeeping"-kontroll) (B og C; proteinuttrykk i prosent ± SEM av dag 0, n = 2). Enzymaktiviteten i cellelysaterne ble målt ved bruk av spesifikke fluorescerende substrater og angitt som gjennomsnittlig aktivitet (ΔF/sekund) relatert til µg totalprotein ± SEM (D; n=1 (dag (-2)- 4). To-utvalgs t-test viste ingen signifikante forskjeller mellom differensieringsdagene.

### 3.2 Effekt av simvastatin på morfologi av skjelettmuskelceller

Myotubenes morfologi ble studert etter behandling i 48 timer med 0, 10, 20, 30, 40 eller 50  $\mu\text{M}$  simvastatin. Observasjonene er illustrert i figur 3.2, hvor celler stimulert med 0, 20 og 50  $\mu\text{M}$  simvastatin er vist.



**Figur 3.2 Morfologi av humane myotuber stimulert med simvastatin i 48 timer.** Primære humane skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis* ble stimulert i 48 timer (dag 5-7 under differensieringen) med simvastatin (20 og 50  $\mu\text{M}$ ). Kontrollceller ble inkubert med 0,1 % DMSO. Bildene er fra lysmikroskopi etter 48 timers stimulering med henholdsvis 4 x (venstre) og 10 x (høyre) forstørrelse.

Ved økende simvastatinkonsentrasjon mistet muskelfibrene sin elongerte form og de ble kortere. Høye konsentrasjoner (30-50  $\mu\text{M}$ ) resulterte i at over halvparten av cellene løsnet fra brønnoverflaten. Denne observasjonen var mest uttalt i 6-brønners brett (figur 3.2) sammenlignet med 25  $\text{cm}^3$  flasker.

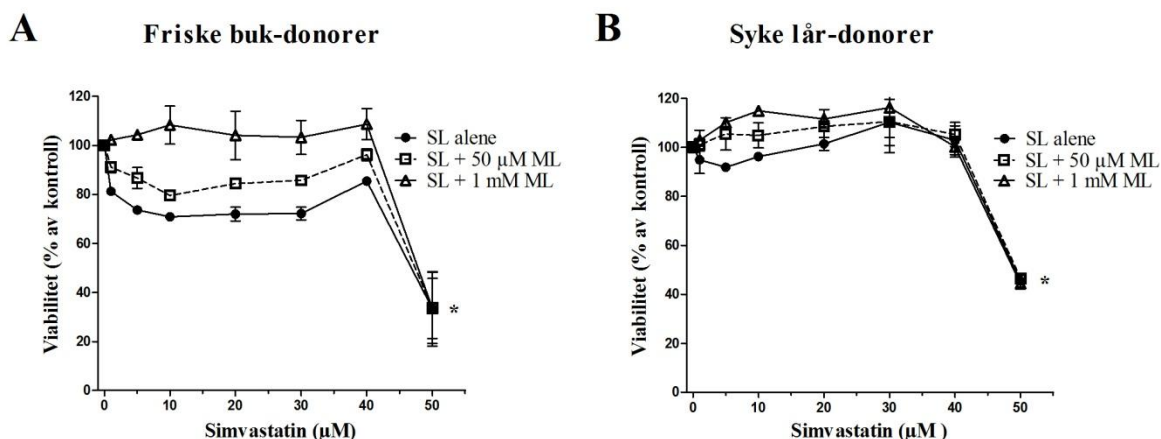
### 3.3 Effekt av simvastatin på celleviabilitet

Det er tidligere vist, og med varierende resultater, at simvastatin reduserer viabilitet av humane skjelettmuskelceller i kultur [37, 44]. Det var derfor interessant å studere nærmere viabiliteten til skjelettmuskelceller etter eksponering for simvastatin, fra friske buk-donor ( *M. obliquus internus abdominis*, figur 3.3 A), sammenlignet med viabiliteten i skjelettmuskelceller fra pasienter med muskelbivirkninger ved bruk av atorvastatin (syke lår-donor fra *M. vastus lateralis*, figur 3.3 B). Da det også foreligger varierende resultater på celleviabilitet med samtidig inkubering av statin med mevalonat, så ble dette også studert [37, 44].

Cellene ble inkubert med simvastatin i konsentrasjonene 0, 1, 5, 10, 20, 30, 40 og 50  $\mu\text{M}$  alene, med eller uten 50  $\mu\text{M}$  eller 1 mM mevalonat i 48 timer.

Simvastatin hadde ikke større myotoksisitet på muskelceller isolert fra pasienter med muskelbivirkninger sammenlignet med muskelceller isolert fra friske frivillige (figur 3.3). Behandling med simvastatin alene så ut til å redusere viabiliteten med tilnærmet 20 % i konsentrasjonsområdet 1-40  $\mu\text{M}$  for de friske buk-donorene, men en signifikant reduksjon i celleviabilitet inntraff først ved 50  $\mu\text{M}$  simvastatin hos begge donorene.

Resultatene viste en  $\text{IC}_{50}$ -verdi for viabilitet på tilnærmet 49  $\mu\text{M}$  simvastatin for begge skjelettmuskeltypene. Høy dose av mevalonat (1 mM) så ut til å motvirke reduksjonen i viabilitet hos celler isolert fra friske frivillige i konsentrasjonsområdet 1-40  $\mu\text{M}$  simvastatin (figur 3.3 A). Denne tendensen var imidlertid ikke signifikant. Lavere konsentrasjon av mevalonat (50  $\mu\text{M}$ ) utviste ikke den samme tendensen. En tenderende reduksjon i viabilitet kunne ikke observeres med noen av mevalonatkonsentrasjonene ved 50  $\mu\text{M}$  simvastatin. Den overnevnte mevalonattendensen var heller ikke tilstede for muskelcellene isolert fra pasienter med muskelbivirkninger (figur 3.3 B).

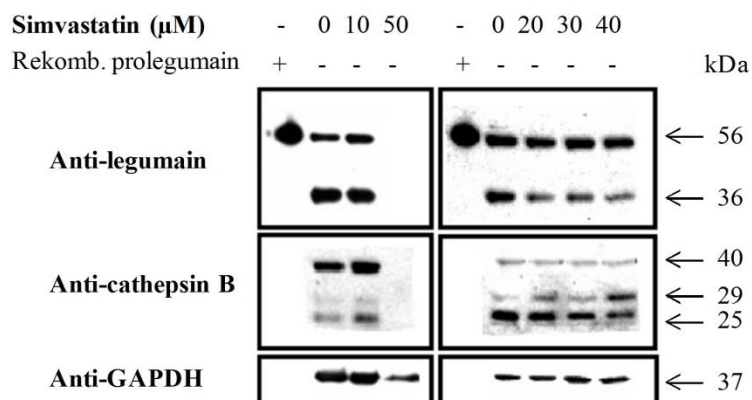


**Figur 3.3.** Effekt av simvastatin med eller uten mevalonat på celleviabilitet av humane myotuber fra *M. obliquus internus abdominis* (friske buk-donor, A) og *M. vastus lateralis* fra donorer med muskelbivirkninger av atorvastatin (syke lår-donor, B). Primære humane skjelettmuskelceller ble inkubert med økende konsentrasjoner av simvastatin (1, 5, 10, 20, 30, 40 og 50 μM) ± mevalonat (50 μM eller 1 mM) på dag 5 av differensieringen. Kontrollcellene ble behandlet med 0,1 % DMSO, løsemiddelet brukt til simvastatin og mevalonat. Etter 48 timer ble cellene tilsatt MTS-reagens og absorbansen ble målt ved 490 nm etter 2 timer. Figuren angir normaliserte gjennomsnittsverdier ± SEM i forhold til ubehandlede kontrollceller (A: n = 2, B: n = 3). \* indikerer  $p < 0,05$ , to utvalgs t-test, ikke normaliserte data, sammenlignet mot kontroll. SL; simvastatin, ML; mevalonat.

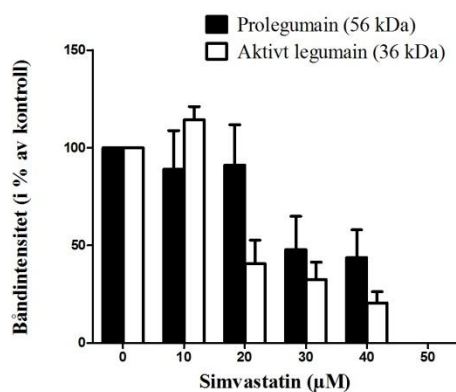
### 3.4 Effekt av simvastatin på legumain og cathepsin B i skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis*

For å studere effekten av simvastatin på legumain og cathepsin B, ble myotuber fra *M. obliquus internus abdominis* inkubert i 48 timer med simvastatin i konsentrasjonene 0, 10, 20, 30, 40 og 50 μM, basert på resultatene fra viabilitetsforsøket.

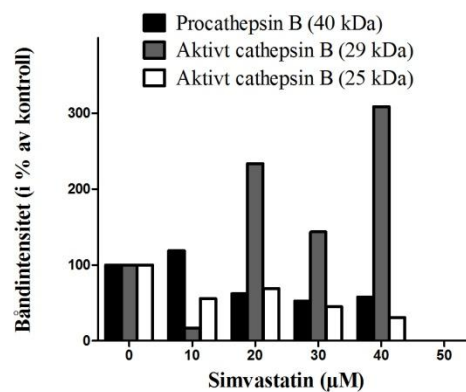
A



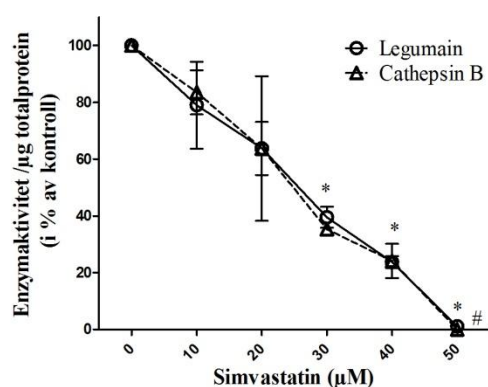
B



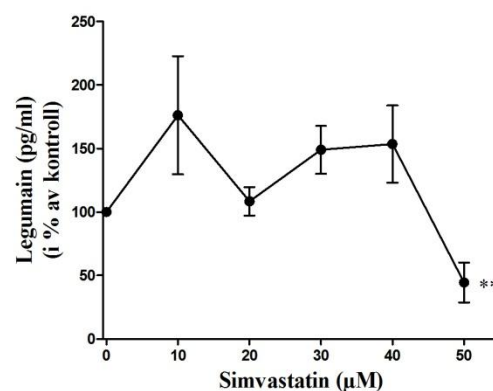
C



D



E



**Figur 3.4** Legumain og cathepsin B ekspresjon (A, B og C), aktivitet (D) og legumain sekresjon (E) etter stimulering av myotuber med simvastatin. Primære humane skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis* ble inkubert med økende konsentrasjoner av simvastatin (0, 10, 20, 30, 40 og 50  $\mu\text{M}$ ) på dag 5 i differensieringen. Kontrollcellene ble inkubert med 0,1 % DMSO. Cellelysaterne ble oppkonsentrert ved acetone-



felling og 12 µg totalprotein ble applisert ved elektroforese og immunoblotting. Blottene ble analysert ved hjelp av spesifikke antistoffer (**A**; anti-legumain representativt blott, n=3, anti-cathepsin B, n=1). Legumain og cathepsin B båndene ble kvantifisert og relatert til GAPDH og β-aktin ("housekeeping"-kontroller) (**B**; proteinuttrykk i prosent ± SEM av dag 0, n = 3, **C**; proteinuttrykk i prosent ± SEM av dag 0, n = 1). Enzymaktiviteten i cellelysatsene ble målt ved bruk av spesifikke fluorescerende substrater og angitt som gjennomsnittlig aktivitet (ΔF/sekund) relatert til µg totalprotein ± SEM (**D**; n = 3). Sekresjonen av totallegumain i kondisjonert medium ble målt med et spesifikt ELISA-kit (**E**; n = 3). \* indikerer  $p < 0,05$ , \*\* indikerer  $p < 0,01$ , to utvalgs t-test, ikke normaliserte data, sammenlignet mot kontroll. # indikerer  $p < 0,0001$ , lineær regresjon.

Immunoblotting av cellelysate viste tilstedeværelse av både prolegumain (56 kDa) og aktiv form av legumain (36 kDa) for 0-40 µM simvastatin (figur 3.4 A). Stimulering med 50 µM simvastatin viste derimot fravær av legumainbånd. Blottet ga inntrykk av redusert prosessering av prolegumain til aktiv form med økende simvastatinkonsentrasjoner, og kvantifiseringen av legumainbåndene i forhold til de respektive "housekeeping"-kontrollene (GAPDH og β - aktin) bekreftet dette (figur 3.4 B).

Immunoblottingen for å detektere proteinekspressjonen av cathepsin B ble i likhet med legumain, utført i to omganger og med prøver fra to ulike forsøk for å få en fullstendig dose-respons deteksjon. Begge blottene viser tilstedeværelsen av både pro- og de to aktive formene av cathepsin B (figur 3.4 A). De to blottene ga imidlertid ulikt proteinmønster for cathepsin B i kontrollene fra hvert forsøk. Kontrollen i det ene forsøket (venstre blott) viste høyest ekspresjon av proformen (40 kDa), mens kontrollen i det andre forsøket (høyre blott) viste høyest ekspresjon av aktiv "two chain"-form (25 kDa). Cathepsin B ble i likhet med legumain, ikke detektert etter stimulering med 50 µM simvastatin (venstre blott). Blottet til høyre antydte en redusert prosessering av 29 kDa til 25 kDa etter stimulering med 40 µM simvastatin, men det var ingen forskjell i ekspresjonen av proformen. Denne membranen ble strippet flere ganger for å oppnå deteksjon av "housekeeping"-kontrollen (GAPDH), og probingen for cathepsin B ble utført til slutt. (Proteinmengden på membranen kan påvirkes av dette, samt at bruk av ulike donorer kan spille inn på resultatet.) Kvantifiseringen som er basert på n = 1 viste en antydning til økende prosessering av procathepsin B til 29 kDa etter stimulering med simvastatin (figur 3.4 C). På bakgrunn av usikkerheten i immunoblottene er det ikke mulig å trekke en konklusjon angående effekten av simvastatin på proteinekspressjonen av cathepsin B.

Både legumain (stigningstall:  $-1,95 \pm 0,15$ ,  $p < 0,0001$ ) og cathepsin B (stigningstall:  $-1,94 \pm 0,21$ ,  $p < 0,0001$ ) viste en doseavhengig reduksjon i aktivitet med økende konsentrasjoner av

simvastatin (figur 3.4 D). Begge proteasene viste en tilnærmet lik reduksjon i aktivitet og 50  $\mu\text{M}$  simvastatin ga ingen aktivitet av proteasene. Den kalkulerte simvastatinkonsentrasjonen som hemmer 50 % av enzymaktiviteten ( $\text{IC}_{50}$ ) var tilnærmet 18  $\mu\text{M}$  for begge proteasene. Simvastatinkonsentrasjon på 30, 40 og 50  $\mu\text{M}$  viste en signifikant reduksjon i proteaseaktivitet sammenlignet med kontroll.

For å undersøke om simvastatin påvirket utskillelsen av legumain, ble totalmengden av legumain i kondisjonert medium målt ved hjelp av et spesifikt ”enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA). Resultatene viste at ustimulerte humane myotuber sekreerte legumain (kontroll) og at det skjedde en signifikant nedgang i sekresjon ved stimulering med 50  $\mu\text{M}$  simvastatin, mens det ikke var signifikante endringer ved lavere simvastatinkonsentrasjoner (figur 3.4 E).

### **3.5 Effekt av simvastatin på legumain og cathepsin B i skjelettmuskelceller fra *M. vastus lateralis***

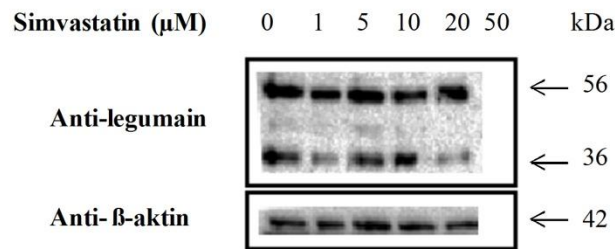
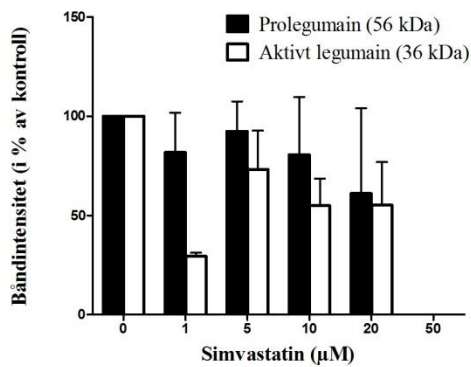
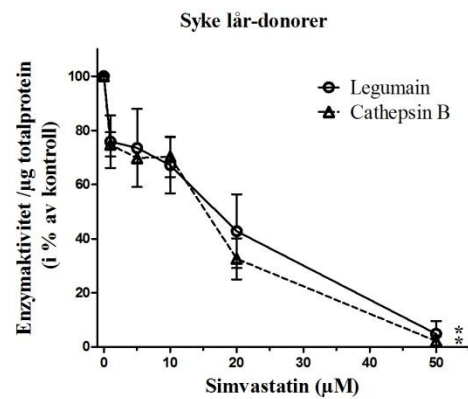
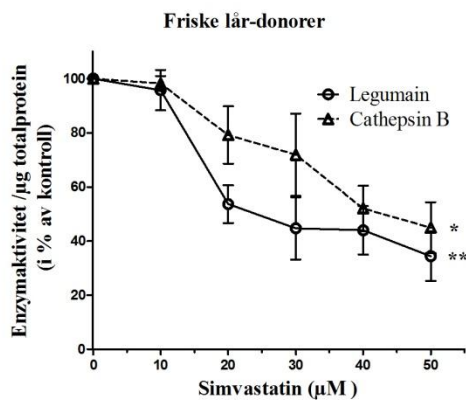
Siden simvastatin viste en doseavhengig reduksjon av proteaseekspresjon og aktivitet i myotuber fra bukmuskel (*M. obliquus internus abdominis*), var det ønskelig å undersøke om effekten var tilsvarende i myotuber fra lårmuskel til friske frivillige donorer (*M. vastus lateralis*). Det var videre interessant å undersøke og sammenligne disse effektene med effekter på myotuber fra lårmuskel til pasienter med muskelbivirkninger av atorvastatin.

Myotuber fra pasienter med muskelbivirkninger ble inkubert i 48 timer med simvastatin (0, 1, 5, 10, 20 og 50  $\mu\text{M}$ ). Lave simvastatinkonsentrasjoner ble valgt med hensyn på en sannsynlig økt sensitivitet for simvastatin i disse cellene i forhold til celler fra friske frivillige donorer.

Immunoblottingen av cellelysate viste tilstedeværelse av både prolegumain (56 kDa) og aktiv form av legumain (36 kDa) etter stimulering med 0, 1, 5, 10 og 20  $\mu\text{M}$  simvastatin, mens legumain ikke ble detektert etter 50  $\mu\text{M}$  (figur 3.5 A). Kvantifiseringen av proteinbåndene viste en tenderende reduksjon i prosessering av prolegumain til aktiv form med økende statinkonsentrasjon (figur 3.5 B).

Målingene av enzymaktivitet i cellelysate viste en tydelig doseavhengig reduksjon i både legumain (stigningstall:  $-1,68 \pm 0,24$ ,  $p < 0,0001$ ) og cathepsin B-aktivitet (stigningstall:  $-1,73 \pm 0,80$ ,  $p < 0,0001$ ) (figur 3.5 C). Den kalkulerte konsentrasjonen som hemmer 50 % av enzymaktiviteten ( $\text{IC}_{50}$ ) var henholdsvis  $\sim 15$  og 13  $\mu\text{M}$  for legumain og cathepsin B.



**A****B****C****D**

**Figur 3.5 Legumain og cathepsin B ekspresjon og aktivitet i myotuber fra *M. vastus lateralis* stimulert med simvastatin.** Primære humane skjelettmuskelceller fra *M. vastus lateralis* fra donorer med (A, B, C) og uten (D) muskelbivirkninger av atorvastatin ble inkubert simvastatin (0, 1, 5, 10, 20 og 50  $\mu\text{M}$ ) på dag 5-7 av differensieringen. Kontrollcellene ble inkubert med 0,1 % DMSO. Proteinekspresjonen ble undersøkt ved elektroforese og immunoblotting. Cellelysaten ble oppkonsentrert ved acetone-felling og 12  $\mu\text{g}$  totalprotein ble applisert i hver brønn. Blottene ble analysert ved hjelp av spesifikke antistoffer (A; anti-

legumain representativt blott,  $n=2-3$ ). Proteinbåndene for legumain ble kvantifisert og relatert til  $\beta$ -aktin ("housekeeping"-kontrolle) (**B**; proteinuttrykk i prosent  $\pm$  SEM av dag 0,  $n = 3$ ). Enzymaktiviteten i cellelysatsene ble målt ved bruk av spesifikke fluorescerende substrater og angitt som gjennomsnittlig aktivitet ( $\Delta F$ /sekund) relatert til  $\mu g$  totalprotein  $\pm$  SEM (**C**;  $n = 3$ ). Myotuber fra friske donorer ble inkubert med simvastatin (0, 10, 20, 30, 40 og 50  $\mu M$ ) og enzymaktivitet i cellelysatsene ble målt og angitt som i **C** (**D**;  $n = 3$ ). \* indikerer  $p < 0,0001$ , \*\* indikerer  $p < 0,01$ , lineær regresjon.

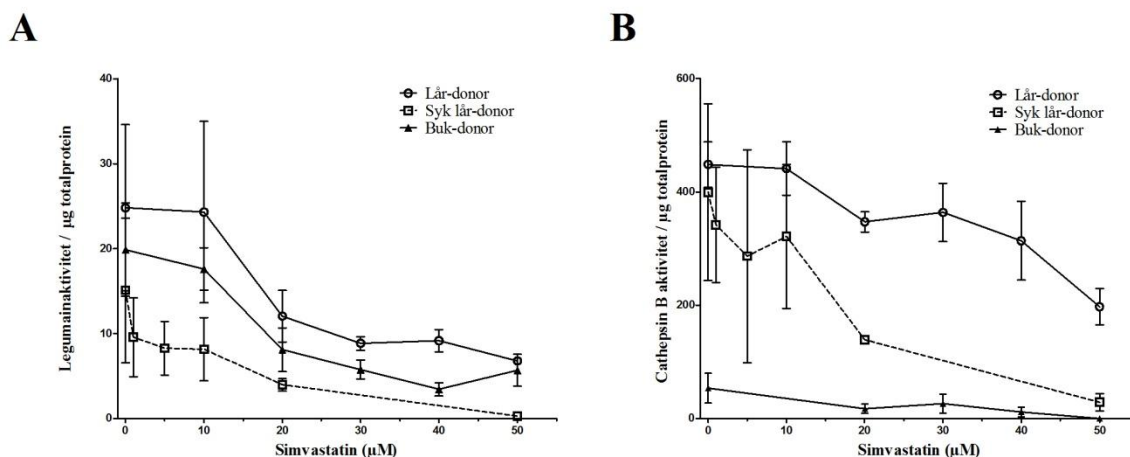
Som sammenligningsgrunnlag ble myotuber fra friske frivillige inkubert med simvastatin (0, 10, 20, 30, 40 og 50  $\mu M$ ). Konsentrasjonene ble her valgt for å kunne sammenligne med resultatene utført på friske celler fra *M. obliquus internus abdominis*. Proteaseaktivitetsdataene viste også her en doseavhengig reduksjon for både legumain (stigningstall:  $-1,34 \pm 0,15$ ,  $p < 0,0001$ ) og cathepsin B (stigningstall:  $-0,99 \pm 0,27$ ,  $p = 0,0018$ ) (figur 3.5 D). Kalkulerte  $IC_{50}$ -verdier var henholdsvis  $\sim 24$  og  $42 \mu M$  simvastatin for legumain og cathepsin B. Immunoblotting av cellelysatsene ble utført, men ga for svake resultater og må derfor gjentas på et senere tidspunkt.

### 3.6 Sammenligning av proteaseaktiviteter i myotuber fra ulike muskeldonorer

Simvastatinkonsentrasjonen som hemmer halve enzymaktiviteten ( $IC_{50}$ ) og proteaseaktivitetsdataene i myotuber fra *M. obliquus internus abdominis* (buk-donor) og *M. vastus lateralis* (lår-donor) fra friske frivillige og *M. vastus lateralis* fra pasienter med muskelbivirkninger av atorvastatin (syk lår-donor) er fremstilt i henholdsvis tabell 3.1 og figur 3.6. Ut fra de kalkulerte  $IC_{50}$ -verdiene er enzymaktiviteten av legumain og cathepsin B mest sensitiv for simvastatinstimulering i syke lår-donorer, og minst sensitive i de friske lår-donorene. Aktivitetsdataene indikerer at de friske lår-donorene har høyest basalaktivitet både av legumain (figur 3.6 A) og cathepsin B (figur 3.6 B) enn både buk-donorene og de syke lår-donorene. De syke lår-donorene ligger lavest i legumainaktivitet (figur 3.6 A), mens buk-donorene utviser lavere cathepsin B-aktivitet både basalt og etter simvastatinstimulering enn de friske og syke lår-donorene (figur 3.6 B).

**Tabell 3.1** Oversikt over den kalkulerte simvastatinkonsentrasjonen som hemmer halve enzymaktiviteten ( $IC_{50}$ ) av legumain og cathepsin B i de ulike muskeldonorene.

Donortype/Protease	Kalkulert $IC_{50}$ -verdi ( $\mu M$ simvastatin)	
	Legumain	Cathepsin B
Frisk buk-donor	18	18
Frisk lår-donor	24	42
Syk lår-donor	15	13

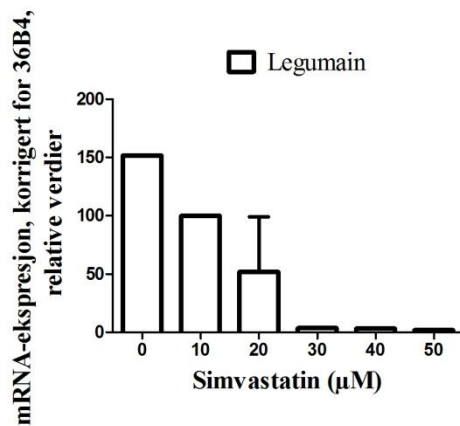


**Figur 3.6 Sammenligning av legumain- (A) og cathepsin B – (B) aktivitet i humane myotuber fra *M. obliquus internus abdominis* (buk-donor), *M. vastus lateralis* (lår-donor) og *M. vastus lateralis* fra pasienter med muskelbivirkninger av atorvastatin (syk lår-donor). Aktivitetsdataene er hentet fra avsnittene 3.4 og 3.5, og fremstilt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM (A og B; n=3 for alle donortypene).**

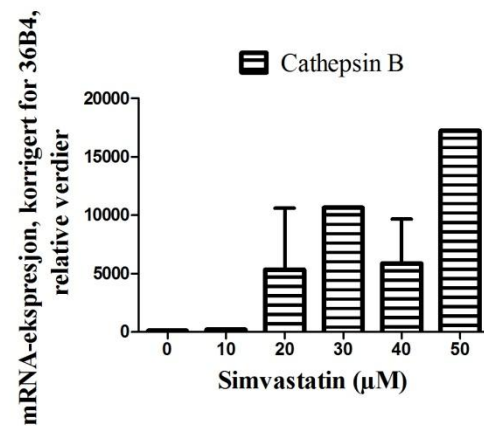
### 3.7 Effekt av simvastatin på mRNA-ekspressjonen av legumain, cathepsin B, cathepsin L og cystatin E/M i humane myotuber

Studier har vist at mRNA for cathepsin B og L oppreguleres ved atrofi og andre degenererende prosesser i skjelettmuskelceller [69]. Wang et al. har vist at legumain mRNA er nedregulert i monocytter/makrofager isolert fra pasienter behandlet med atorvastatin [12]. Med bakgrunn i dette og tidligere resultater i oppgaven var det derfor av interesse å studere effekt av simvastatin på mRNA-ekspressjonen av legumain, cathepsin B og L, samt den endogene proteaseinhibitoren cystatin E/M. Messenger RNA-ekspressjonen ble analysert ved real-time PCR og resultatene er angitt som relative verdier normalisert mot kontroll, og er korrigert for "housekeeping"-kontrollen 36B4 (figur 3.7). Spredningen i dataene er generelt for stor og forsøkene for få til at det kan trekkes konklusjoner, men resultatene indikerer imidlertid en kraftig nedregulering av legumain mRNA (figur 3.7 A) og en oppregulering av mRNA for både cathepsin B, L og cystatin E/M (figur 3.7 B-D).

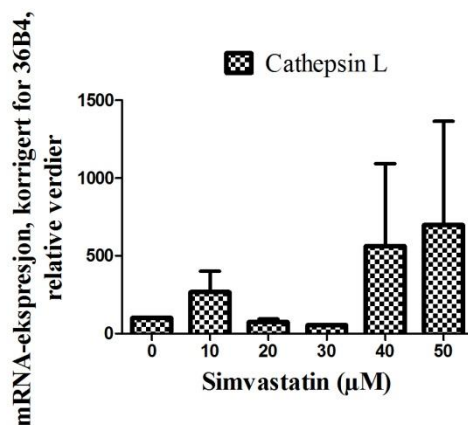
A



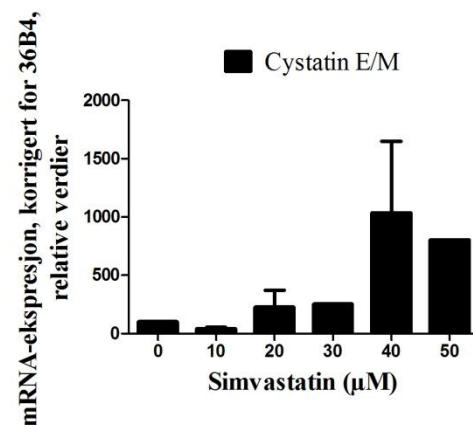
B



C



D

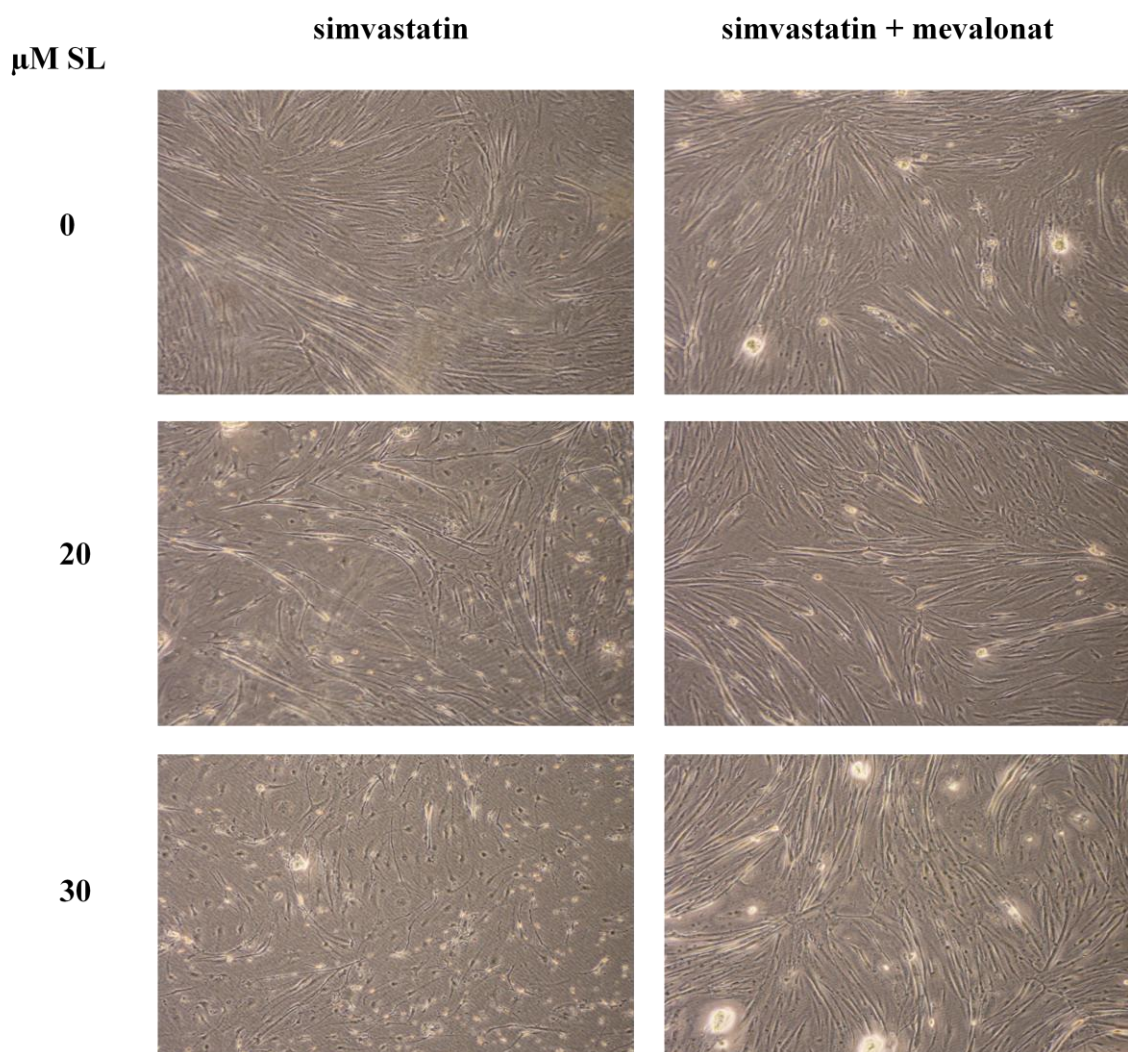


**Figur 3.7 Messenger RNA-ekspresjonen av legumain (A), cathepsin B (B), cathepsin L (C) og cystatin E/M (D) i myotuber etter stimulering med simvastatin.** Primære humane skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis* ble inkubert med simvastatin (0, 10, 20, 30, 40 og 50 μM) på dag 5-7 i differensieringen. Kontrollcellene ble inkubert med 0,1 % DMSO. Messenger RNA-ekspresjonen ble undersøkt ved real-time-PCR og spesifikke primere. Dataene er angitt som relative verdier i forhold til kontroll ± SEM (B, C, D). Legumaindataene er angitt som relative verdier til 10 μM simvastatin, da det mangler ekspresjonsdata for kontrollcellene for den ene parallellen (n = 1-2).

### 3.8 Effekt av simvastatin med eller uten mevalonat på cellemorfologi og legumain

Statiner er vist å aktivere caspase-3 i humane skjelettmuskelceller i kultur og inkubering av statin med mevalonat motvirket denne aktiveringen [37]. Det var derfor ønskelig å studere om mevalonat hadde innvirkning på legumain og cathepsin B i myotuber stimulert med simvastatin.

Myotuber fra *M. obliquus internus abdominis* ble stimulert i 48 timer med simvastatin (0, 20, 25, 30, 40 og 50  $\mu\text{M}$ ) med eller uten 1 mM mevalonat. Bildene i figur 3.8 illustrerer morfologien som ble observert i mikroskopet, og kontrollceller og celler stimulert med 20 og 30  $\mu\text{M}$  simvastatin  $\pm$  mevalonat er vist.



**Figur 3.8** Morfologi av humane myotuber stimulert med simvastatin alene eller sammen med mevalonat. Kontrollceller (myotuber fra *M. obliquus internus abdominis*) ble inkubert

med henholdsvis 0,1 % DMSO eller 1 mM mevalonat alene (øverst). Myotuber ble stimulert på dag 5-7 i differensieringen med 20 og 30  $\mu\text{M}$  simvastatin alene (venstre) eller sammen med mevalonat (høyre). Alle lysmikroskopibildene er med 4 x forstørrelse og tatt på dag 7.

Som tidligere vist i figur 3.2 mistet muskelfibrene sin elongerte form og ble mindre med økende konsentrasjoner av simvastatin alene (venstre kolonne). Ved inkubering av simvastatin med mevalonat var denne tendensen mindre uttalt, og fibrene beholdt sin elongerte form og tetthet (høyre kolonne). Tettheten ble også gjenspeilet i et lavt antall løse celler i mediet ved stimulering med simvastatin sammen med mevalonat, mot mange løse celler ved simvastatinbehandling alene. Ved høyere konsentrasjoner av simvastatin (40 og 50  $\mu\text{M}$ ) viste ikke mevalonat den samme beskyttende effekten på de simvastatininduserte endringene i morfologi (ikke vist).

For å studere eventuell reverserende effekt av mevalonat på statinindusert inhibisjon av legumain og cathepsin B, ble også enzymekspresjon og aktivitet målt.

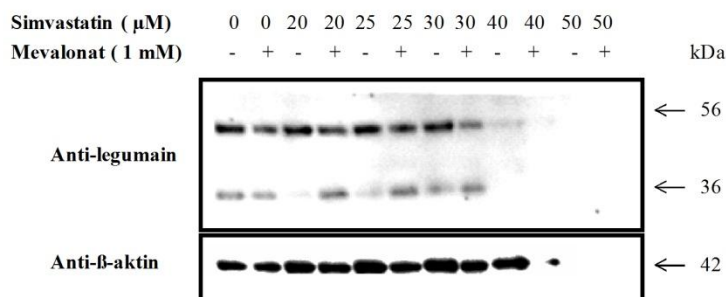
Immunoblotting av cellelysater viste tilstedeværelse av prolegumain (56 kDa) og aktiv form av legumain (36 kDa) for simvastatinkonsentrasjonene 0, 20, 25 og 30  $\mu\text{M}$   $\pm$  mevalonat (figur 3.9 A). Både visuelt inntrykk og kvantifisering av proteinbåndene viste tendens til økt ekspresjon av begge legumainformene med mevalonat tilstede i forhold til simvastatin alene, men økningen var ikke signifikant (figur 3.9 B). Prosesseringen av prolegumain til aktivt legumain så ut til å være større ved tilstedeværelse av mevalonat ved kvantifisering, noe som også immunoblottet gav et visuelt inntrykk av. På grunn av tidsmangel ble ikke immunoblotting av cathepsin B utført.

Legumainaktiviteten viste som tidligere i avsnitt 3.4 en doseavhengig reduksjon med simvastatin alene (stigningstall:  $-2,09 \pm 0,27$ ,  $p < 0,0001$ ), men denne reduksjonen ble ikke reversert ved inkubering av simvastatin sammen med mevalonat (stigningstall:  $-1,93 \pm 0,39$ ,  $p = 0,0002$ ) (figur 3.9 C).

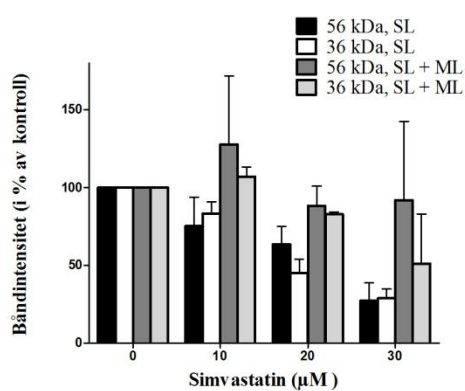
I likhet med legumain og som tidligere vist i avsnitt 3.4, var det en signifikant reduksjon i cathepsin B-aktivitet med simvastatin alene (stigningstall:  $-2,24 \pm 0,26$ ,  $p < 0,0001$ ), men også sammen med mevalonat (stigningstall:  $-2,33 \pm 0,34$ ,  $p = 0,0001$ ) (figur 3.9 D).



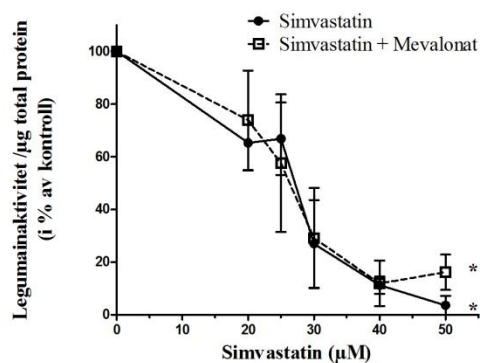
A



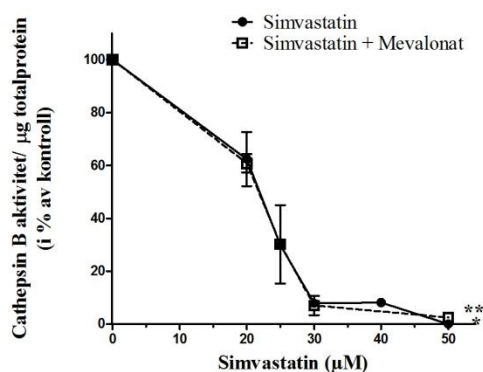
B



C



D



**Figur 3.9 Legumain ekspresjon (A og B) og legumain- (C) og cathepsin B-aktivitet (D) i myotuber etter stimulering med simvastatin alene eller sammen med mevalonat.** Primære humane skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis* ble inkubert i 48 timer (dag 5-7 under differensieringen) med simvastatin (0, 20, 25, 30, 40 og 50  $\mu\text{M}$ ) med eller uten 1 mM mevalonat. Kontrollcellene ble inkubert med 0,1 % DMSO. Proteinekspressjonen ble undersøkt ved elektroforese og immunoblotting. Cellelysaten ble oppkonsentrert ved acetone-felling og 12  $\mu\text{g}$  totalprotein ble applisert i hver brønn. Blottene ble analysert ved hjelp av spesifikke antistoffer (A; anti-legumain representativt blott,  $n=3$ ). Legumainekspressjonen ble kvantifisert ved å relatere proteinbåndene for proteasene med  $\beta$ -aktin ("housekeeping"-kontroll)-intensitet

(B; proteinuttrykk i prosent  $\pm$  SEM av dag 0,  $n = 3$ ). Enzymaktiviteten i cellelysatsene målt ved bruk av spesifikke fluorescerende substrater og angitt som gjennomsnittlig aktivitet ( $\Delta F$ /sekund) relatert til  $\mu g$  totalprotein  $\pm$  SEM (C og D;  $n = 3$ ). \* indikerer  $p < 0,0001$ , \*\* indikerer  $p < 0,001$ ; lineær regresjonsanalyse.

### 3.9 Effekt av simvastatin med eller uten mevalonat på glukoseoksidasjon og -opptak

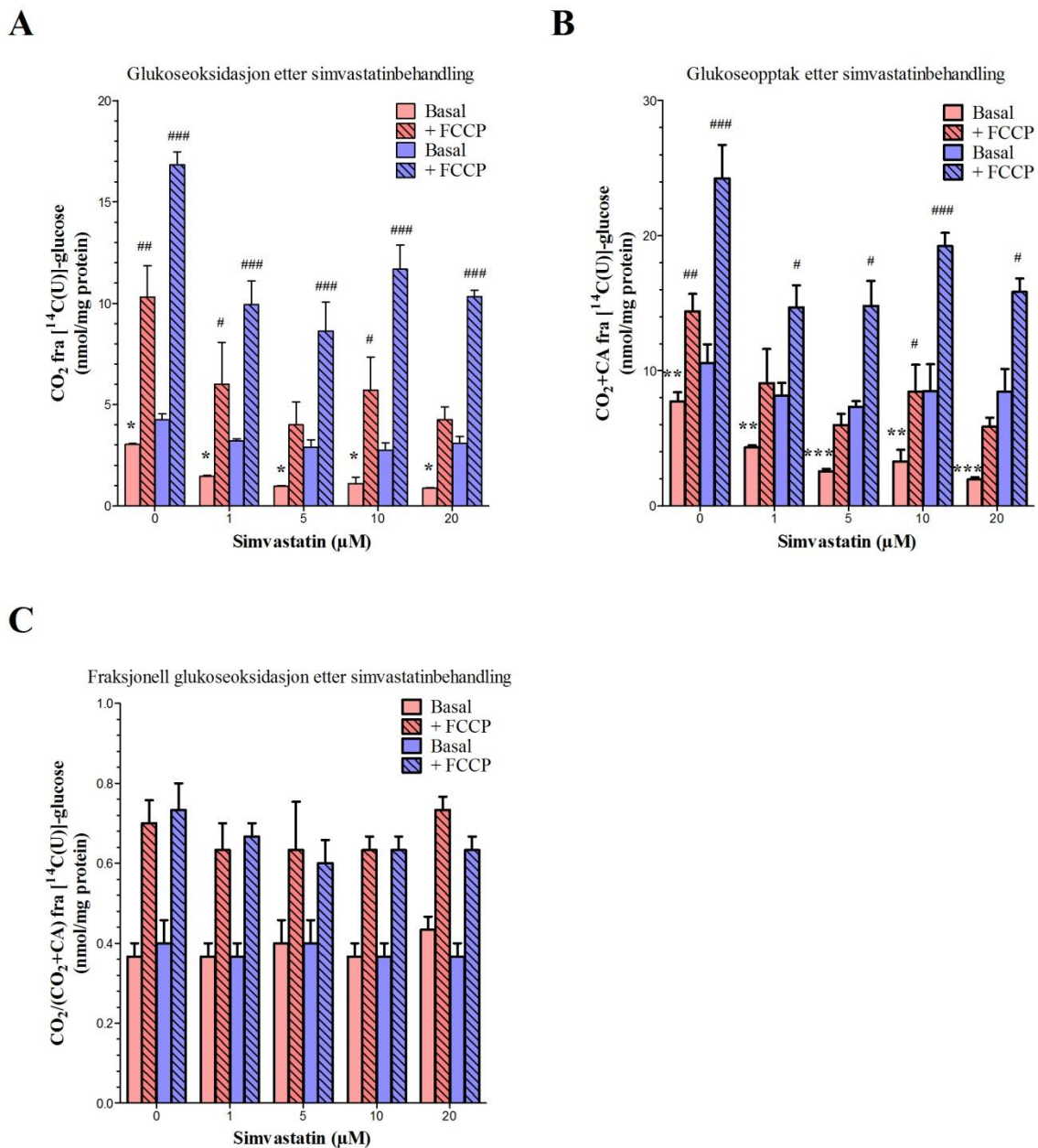
Flere studier har vist at statiner svekker den mitokondrielle respirasjonen [41, 44, 46, 47], og det var derfor av interesse å undersøke effekten av simvastatin på oksidasjon og opptak av glukose i skjelettmuskelceller fra både *M. obliquus internus abdominis* og *M. vastus lateralis*, samt undersøke om inkubering av simvastatin med mevalonat påvirket resultatet.

Cellene ble preinkubert med simvastatin (0, 1, 5, 10 og 20  $\mu M$ ) alene eller med 50 eller 1000  $\mu M$  mevalonat i 48 timer (dag 5-7 under differensieringen). Kontrollcellene ble tilsatt 0,1 % DMSO. Akuttmedium bestående av isotopen D-[U- $^{14}C$ ] (1  $\mu Ci/ml$ , 200  $\mu M$ ) med eller uten 1  $\mu M$  FCCP ble tilsatt på dag 7 (Appendiks 7.2 og 7.3). Både produsert  $CO_2$  og celleassosiert radioaktivitet samt totalproteinmengden ble deretter målt.

Resultatene vedrørende simvastatins effekt er fremstilt i figur 3.10 og er illustrert ved glukoseoksidasjon (A), glukoseopptak (B) og fraksjonell glukoseoksidasjon (C). Preinkubering med simvastatin gir en doseavhengig signifikant reduksjon i glukoseoksideringen (basal) hos muskeldonorene fra *M. obliquus internus abdominis* (figur 3.10 A, rosa søyler). Den samme tendensen var også observert for muskeldonorene fra *M. vastus lateralis* (blå søyler). Akuttbehandling med FCCP ga  $\sim 2$ -3 gangers økning i glukoseoksidering generelt for samtlige behandlinger i begge muskeldonorene hvor en sammenligning av basaloksidasjon mot oksidasjon etter FCCP-behandling viste en signifikant forskjell henholdsvis for simvastatinkonsentrasjonene 0, 1 og 10  $\mu M$  hos muskeldonorene fra *M. obliquus internus abdominis* og for alle simvastatinkonsentrasjoner hos muskeldonorene fra *M. vastus lateralis*. Reservekapasiteten definert som oksidasjon etter FCCP-behandling minus basaloksidasjon, var ikke signifikant endret selv om det var en tendens til reduksjon ved økende simvastatinkonsentrasjoner. Reservekapasiteten var større for muskeldonorene fra *M. vastus lateralis* enn for *M. obliquus internus abdominis*. Den samme nedadgående tendensen var gjeldene for glukoseopptaket, der økende konsentrasjoner av simvastatin reduserte basalnivået signifikant for muskeldonerer fra *M. obliquus internus abdominis* (figur 3.10 B). Oksidasjonskapasiteten var signifikant forskjellig mellom ubehandlet kontroll og 10



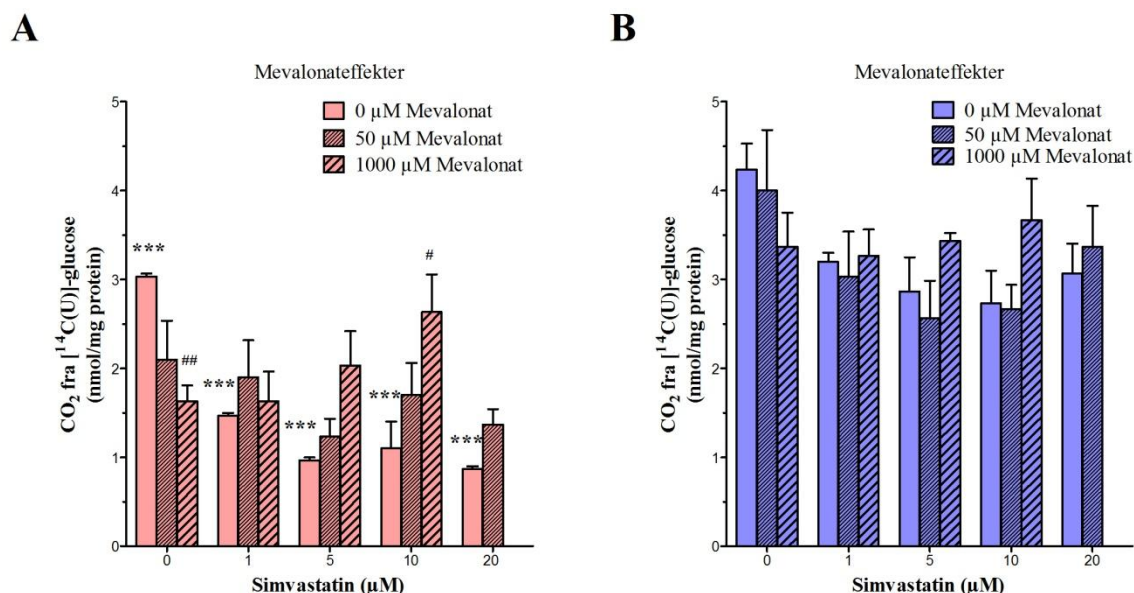
$\mu\text{M}$  simvastatin for sistnevnte donortype, og for alle statinkonsentrasjonene for *M. vastus lateralis*. Den fraksjonelle oksideringen av glukose ble ikke påvirket av økende konsentrasjoner av simvastatin (figur 3.10 C). Behandling med FCCP økte den fraksjonelle oksideringen i forhold til basal hos begge donorer uavhengig av simvastatinbehandlingene. Denne effekten favoriserer oksidasjon av glukose i forhold til opptak hos myotubene. Celleassosiert opptak av glukose er ikke fremstilt alene, men utgjør differansen mellom resultatene i figur B og A.



**Figur 3.10** Oksidasjon og glukseopptak i humane myotuber fra *M. obliquus internus abdominis* og *M. vastus lateralis* etter stimulering med simvastatin. Figuren viser

glukoseoksidasjonen (A), glukoseopptaket (B) og fraksjonell glukoseoksidasjon (C) etter behandling med simvastatin. Primære humane skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis* og *M. vastus lateralis* ble preinkubert med simvastatin (0, 1, 5, 10 og 20  $\mu\text{M}$ ) i 48 timer (dag 5-7 under differensieringen). Kontrollcellene ble preinkubert med 0,1 % DMSO. Deretter ble cellene inkubert i 4 timer med akuttmedium tilsatt isotopen  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glukose ( $1\mu\text{Ci/ml}$ , 200  $\mu\text{M}$ )  $\pm$  1  $\mu\text{M}$  FCCP. Etter høsting ble radiomerket  $\text{CO}_2$ , CA og totalprotein målt. Data er vist som gjennomsnitt  $\pm$  SEM. \* indikerer  $p < 0,05$ , \*\* indikerer  $p < 0,01$ , \*\*\* indikerer  $p < 0,001$  (1-veis-ANOVA, sammenlignet med kontroll,  $n = 3$ ). # indikerer  $p < 0,05$ , ## indikerer  $p < 0,01$ , ### indikerer  $p < 0,001$  (2-veis-ANOVA, sammenlignet med respektiv basalnivå,  $n = 3$ ).

Det var videre interessant om effektene observert med simvastatin på glukoseoksidasjon og -opptak ville reverseres av mevalonat. Mevalonats effekter på basalnivået av glukoseoksideringen hos muskeldonor fra *M. obliquus internus abdominis* (rosa søyler) og *M. vastus lateralis* (blå søyler) er fremstilt under (figur 3.11). Verken 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  mevalonat utviser en statistisk signifikant reversering av simvastatineffekten på glukoseoksideringen hos muskeldonor fra *M. vastus lateralis*. Hos muskeldonor fra *M. obliquus internus abdominis* ble det observert en tendens til reversering av simvastatin-hemmet glukoseoksidasjon med mevalonat, og reverseringen var statistisk signifikant ved behandling med 10  $\mu\text{M}$  simvastatin sammen med 1 mM mevalonat.



**Figur 3.11** Glukoseoksidasjon i humane myotuber fra *M. obliquus internus abdominis* og *M. vastus lateralis* etter stimulering med simvastatin med eller uten 50 eller 1000  $\mu\text{M}$  mevalonat. Figuren viser glukoseoksidasjonen i *M. obliquus internus abdominis* (A) og i *M. vastus lateralis* (B) etter behandling med simvastatin  $\pm$  mevalonat. Primære humane skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis* og *M. vastus lateralis* ble preinkubert

med simvastatin (0, 1, 5, 10 og 20  $\mu\text{M}$ )  $\pm$  50 eller 1000  $\mu\text{M}$  mevalonat i 48 timer (dag 5-7 under differensieringen). Kontrollcellene ble preinkubert med 0,1 % DMSO. Deretter ble cellene inkubert i 4 timer med akuttmedium tilsatt isotopen [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]glukose (1  $\mu\text{Ci/ml}$ , 200  $\mu\text{M}$ ). Etter høsting ble radiomerket  $\text{CO}_2$ , CA og totalprotein målt. Data er vist som gjennomsnitt  $\pm$  SEM. \* indikerer  $p < 0,001$  (1-veis-ANOVA, sammenlignet med kontroll,  $n = 3$ ). # indikerer  $p < 0,05$ , ## indikerer  $p < 0,01$  (2-veis-ANOVA, sammenlignet med respektiv kontroll uten mevalonat,  $n = 3$ ).

## 4 Diskusjon

Forekomsten av hyperlipidemi er økende i befolkningen og forskrivningen av statiner øker tilsvarende [3, 7, 8], fordi det foreligger god dokumentasjon på statinenes evne til å redusere morbiditet og mortalitet knyttet til hjerte-karsykdom [1-4]. Statiner er generelt godt tolererte legemidler, men muskelbivirkninger som myalgi, myositt, myopati og rabdomyolyse forekommer [5, 20, 21, 25, 26]. Det er estimert at muskelbivirkninger forekommer hos så mange som 10-15 % av statinbrukere, og forekomsten er assosiert med flere predisponerende faktorer som økende alder, andre sykdommer og polyfarmasi [5, 20]. Prevalensen av den alvorligste muskelbivirkningen, rabdomyolyse, er imidlertid lav. Fokuset på muskelbivirkninger av statiner økte etter flere rapporterte tilfeller av rabdomyolyse ved cerivastatinbehandling, og etterfølgende tilbaketrekking av legemidlet fra markedet i 2001 [33]. Mekanismen for de statininduserte muskelbivirkningene er ikke fullstendig kartlagt, og trolig er det flere faktorer som spiller inn.

Det var i denne oppgaven interessant å kartlegge rollen til de lysosomale proteasene legumain og cathepsin B ved statinindusert myotoksisitet. Bakgrunnen for dette er at statiner er vist å inducere apoptose i skjelettmuskel *in vitro* [37, 44]. Aktiviteten til caspasene, som er en essensiell del av apoptosemaskineriet [42], og har strukturlikhet med legumain [50, 51, 67], er vist å øke ved statinindusert myotoksisitet [37]. Legumain er vist å være overuttrykt i kreftceller og høyt uttrykk av proteasen er assosiert med dårlig prognose. En av årsakene til kreftcellenes ukontrollerte vekst er at de har liten tendens til å undergå apoptose [54, 55]. Det kan derfor tenkes at legumain har en antiapoptotisk effekt, men mekanismen for dette i mennesket er ikke kjent, selv om en slik antiapoptotisk effekt er beskrevet i protozoen *blastocystis* [68]. Legumain er ikke studert i human skjelettmuskel, og vi har derfor benyttet cathepsin B som sammenligningsgrunnlag, siden uttrykk og aktivitet av cathepsin B tidligere er karakterisert i skjelettmuskel [69], og at cathepsin B er vist å spille en rolle i apoptoseprosessen i både skjelettmuskel og andre celletyper [49, 69, 71, 74-76]. Cathepsin B har det til felles med legumain at begge er lysosomale cysteinproteaser. Legumain bidrar også i prosesseringen av cathepsin B [52, 60]. Det er ikke kjent hvordan statiner påvirker aktivitet og ekspresjon av disse proteasene i skjelettmuskel.

## 4.1 Valg av cellemodeller

For å studere statineffekter på human skjelettmuskel *in vitro* benyttes primære humane skjelettmuskelceller som modellsystem. En slik cellemodell opparbeides ved proliferasjon og differensiering av satelittceller som er isolert fra biopsier av human skjelettmuskel. Satelittceller er udiffereensierte myogene forløperceller som er nødvendig for den regenerative kapasiteten til muskelfibre. I modne muskelfibre foreligger satelittcellene i dvale, men aktiveres som respons på traume, nekrose eller apoptose, trening eller annen muskelbelastning. Satelittcellene er en heterogen gruppe av celler som enten kan proliferere til differensierte muskelceller og fusjonere med eksisterende muskelfibre, eller de kan gi opphav til nye satelittceller [84, 85]. Satelittcellene vil ha den samme genotypen som de omsluttende muskelfibre har, og underliggende genetiske variasjoner som kan være årsaken til muskelbivirkningene av statiner, vil derfor også finnes i satelittcellene. Miljøfaktorer er vist å kunne påvirke genuttrykket i skjelettmuskelceller under utvikling og regenerering (epigenetikk) [86], men det er ikke kjent i hvor stor grad satelittceller som ligger i dvale vil påvirkes av det fysiologiske miljøet i muskelen.

De fleste publiserte studier har benyttet satelittceller som er isolert fra *M. vastus lateralis* fra friske frivillige. Dette skyldes nok at det er forholdsvis enkelt å ta muskelbiopsier fra denne muskelen. Symptomene på muskelbivirkninger av statiner forekommer også hyppigst og er mest uttalt i lårmuskelen [27]. Det ble i denne oppgaven benyttet både primære humane skjelettmuskelceller fra *M. obliquus internus abdominis* fra friske frivillige, men også primære humane skjelettmuskelceller fra *M. vastus lateralis* fra både friske frivillige og fra pasienter med påviste muskelbivirkninger av atorvastatin, heretter kalt ”syke lår-donor”. Valg av cellemodell er basert på tilgjengeligheten til de enkelte donorcellene under studien. De friske frivillige muskeldonorene er ikke tidligere eksponert for statiner, og det er derfor ikke kjent hvordan de ville reagert på en eventuell statinbehandling. Her vil predisponerende faktorer som statindose, andre legemidler, andre sykdommer [5, 17, 18, 20] og eventuelle genetiske mutasjoner spille inn [20, 35, 36]. Disse faktorene vil imidlertid ikke gjenspeiles i en *in vitro*-modell. Det kan tenkes at muskeldonorene med påviste muskelbivirkninger av atorvastatin kan være mer eller mindre sensitive ved eksponering for statin også *in vitro*, og satelittcellene i biopsien vil sannsynligvis allerede være eksponert for atorvastatin. Det er ikke kjent om atorvastatin er seponert før biopsiene ble tatt, hvor lenge pasientene har stått på atorvastatin eller hvilken dose som er benyttet. Det er heller ikke kjent om det ble foretatt målinger av kreatinkinase (CK) i serum ved diagnostiseringen av muskelbivirkningene. CK

indikerer muskelcelleskade, men dette er en sen markør og økte CK-nivåer i serum er ikke nødvendigvis sammenfallende med muskelcelleforandringer [20, 25].

Det foreligger varierende data i litteraturen i forhold til om statiner utøver sin toksisitet selektivt på type I eller type II fibre i skjelettmuskel [22, 23]. Type I og type II fibre benytter seg av henholdsvis oksidativ fosforylering og glykolysen for å dekke sitt energibehov, og har ulik evne til utholdenhet og kraftutvikling [22-24]. Vi har ikke undersøkt fibersammensetningen i våre cellemodeller eller i biopsiene som er benyttet for isoleringen av satelittcellene. Satelittceller som dyrkes *in vitro* vil ikke påvirkes av det fysiologiske miljøet i muskelen, og kan i utgangspunktet differensiere til både type I og type II. Resultater fra forskningsgruppen MURES ved avdelingen, tyder på at satelittcellene isolert fra *M. obliquus internus abdominis* hovedsakelig utvikler seg til type II fibre, da de i liten grad forbrenner fettsyrer og utviser lav insulinsensitivitet (personlig meddelelse, Eili Tranheim Kase).

Noen lysosomale proteaser har begrenset distribusjon og vevs-spesifikke funksjoner, mens andre har en mer generell distribusjon og er tilstede i de fleste vev og celletyper. Ekspresjon og aktivitet av legumain og cathepsin B i skjelettmuskel av ulik anatomisk lokalisasjon er ikke kartlagt. Men de enzymatiske egenskapene til cathepsinene i muskel er vist å være uavhengig av hvilken art de er observert i og muskelens metabolske og kontraktile egenskaper [69]. Med bakgrunn i proteasenes rolle i cellehomeostasen og ved differensiering av myoblaster, kan det tenkes at en ubalanse i cellehomeostasen, inflammasjonstilstander og regenerering av vev vil kunne påvirke proteaseekspresjon og -aktivitet. Lysosomale proteaser er vist å være involvert i muskelproteolyse ved skjelettmuskelatrofi, og cathepsinene er vist å øke både på mRNA-, protein- og aktivitetsnivå [87].

## 4.2 Valg av simvastatin- og mevalonatkonsentrasjoner

Eksposeringen for statiner *in vivo* strekker seg over lang tid hos pasienter som får slik behandling. Da dette ikke er gjennomførbart *in vitro*, og spesielt ikke for primære cellekulturer, så har vi benyttet høyere molare konsentrasjoner enn det som er aktuelt *in vivo*. Eksposeringen er foretatt over et tidsintervall på 24 og/eller 48 timer i ferdig differensierte myotuber (dag 5-7 etter start av differensiering). Valg av tidspunkt for stimulering og eksponeringstid er basert på morfologiske observasjoner og tidligere studier. Differensieringsmarkører er ikke benyttet. For forsøkene der eksponeringen ble foretatt både i 24 og 48 timer, ble det ikke observert store forskjeller i verken morfologi,

proteaseekspresjon eller -aktivitet. *In vitro* resultatene som presenteres i oppgaven kan ikke direkte ekstrapoleres til en *in vivo* situasjon da blant annet det fysiologiske miljøet, farmakokinetikk og andre predisponerende faktorer spiller inn på responsen, men resultatene kan gi en god indikasjon på hvilke cellulære responser som kan inntreffe.

Simvastatin administreres som et lakton-prodrug, og laktongruppen hydrolyseres til den aktive syreformen etter opptak fra GI-traktus. AUC-ratioen mellom lakton- og syreformen for simvastatin *in vivo* er 2,15 [16], og laktonformen av simvastatin har utvist størst myotoksisk potensiale *in vitro* [13]. På bakgrunn av dette, og da prevalensen av muskelbivirkninger av statiner er høyest for simvastatin [30, 31], er laktonformen av simvastatin benyttet som forsøkssubstans for å studere effekten av statiner på de lysosomale proteasene og mitokondriefunksjonen i humane skjelettmuskelceller. Laktonformen av simvastatin er mer lipofil enn syreformen, og de to formene har en log P-verdi på henholdsvis 4,39 og 3,85 [16]. Økende lipofilisitet er fordelaktig med tanke på penetrering av og akkumuleringen i myotubene. Det er vist at en dosering på 40 mg simvastatin daglig kan gi en serumkonsentrasjon på 1,2  $\mu\text{M}$  når CYP3A4-metabolismen hemmes [18]. Tidligere simvastatinkonsentrasjoner benyttet i *in vitro*-studier har ligget i intervallet 1-400  $\mu\text{M}$  [13, 44]. På bakgrunn av at studier utført i nyere tid har vist at viabiliteten til humane myotuber i kultur er sensitive for konsentrasjoner helt nede i 1  $\mu\text{M}$  [44], har vi benyttet laktonformen av simvastatin i konsentrasjonsområdet 1-50  $\mu\text{M}$  avhengig av type forsøk og hvilken respons som skulle studeres.

Da vi i første omgang var interessert i å undersøke om statineffekten er direkte relatert til hemmingen av enzymet HMG-CoA-reduktase, ble mevalonat benyttet som kontrollsubstans. I likhet med simvastatin, foreligger mevalonat både på syre- og laktonform. Likevekten mellom formene påvirkes av pH, og laktonformen er mer lipofil enn syreformen [88]. De fleste studiene benytter mevalonat på syreform [37, 44]. En tidligere masteroppgave utført ved avdelingen (Kjersti Hoel, 2008) viste at mevalonatformen ikke påvirket resultatet for statinresponsen på cellene [89]. På bakgrunn av tilgjengelighet og laktonformens lipofile egenskaper, har vi derfor valgt bare å benytte mevalonolakton som kontrollsubstans. Samme nevnte masteroppgave viste at statinresponsen ikke ble påvirket av om mevalonat ble tilsatt før eller samtidig med statinet, og vi har derfor valgt å tilsette de to substansene samtidig, noe som er i tråd med andre liknende studier [37, 44]. Flere nyere studier har valgt å tilsette statin samtidig med isoprenoidene farnesylpyrofosfat (FPP) eller geranylgeranylpyrofosfat (GGPP),

som er nedstrømsprodukter i mevalonatsynteseveien [5, 40]. Isoprenoidene inngår i modifisering av proteiner, og apoptose forårsaket av statiner er vist å motvirkes ved inkubering av statin med FPP og GGPP *in vitro* [39].

### **4.3 Karakterisering av legumain og cathepsin B under differensieringen av myoblaster til myotuber**

Både legumain og cathepsin B er vist å være høyest uttrykt i nyrer og placenta, men er også tilstede i skjelettmuskel fra henholdsvis rotte og menneske [56, 69]. Den konkrete rollen til de ulike lysosomale proteasene i muskelfysiologi og patofysiologi er vanskelig å kartlegge. Studier utført i ”knockout”-mus viser ofte at inaktivering av genet for en spesifikk protease ikke nødvendigvis gir endringer i fenotype. Dette skyldes at flere av proteasene har overlappende spesifisitet og substrater (”redundancy”) [90]. Kartlegging av rollen til lysosomale proteaser er også avhengig av at substrater leveres til lysosomene. Basalekspresjonen og aktiviteten av proteasene og identifiserte substrater gir likevel et innblikk i proteasenes rolle. Cathepsin B foreligger i lave konsentrasjoner i modne myofibre, men under differensieringen av myoblaster til myotuber er det imidlertid vist at ekspresjonen av cathepsin B er høy [69]. Dette kan ha sammenheng med at proteolytiske enzymer spiller en viktig rolle i mobiliseringen av membranproteiner og reorganiseringen av cytoskjelettet. Ekspresjonen kontrolleres av hormoner, nervestimulering, strekk og interaksjon med ekstracellulær matriks [69]. Cathepsin B er også vist og sekreses ut av cellen under differensieringen, noe som kan tyde på at proteasen også har ekstracellulære funksjoner. Cathepsin B har i likhet med andre cathepsiner et relativt uspesifikt kløyvingsmønster, og foretrekker aminosyren arginin i P2-posisjon og en stor hydrofob gruppe i P1'-posisjon [91]. Men enzymet er vist å degradere spesifikke muskelproteiner *in vitro*, som myosin ”heavy chain”, troponin T, troponin I og tropomyosin [69]. Legumain er ikke studert under differensiering av myoblaster, og det foreligger heller ikke studier som har undersøkt spesielle muskelsubstrater for legumain.

Karakteriseringen av legumain i humane myotuber viste tydelig at både proform og aktiv form av proteasen var tilstede. Resultatene viste en økende tendens til prosessering av proformen til aktivt legumain gjennom differensieringsperioden. På bakgrunn av publiserte data som viser cathepsinenes høye ekspresjon under differensieringen og lave ekspresjon i modne myofibre, vil man forvente at andre lysosomale proteaser viste samme



ekspresjonsmønster [69]. Proteinekspresjonen av legumain var som forventet lavere på differensieringsdag 7 enn på dag 0, 2 og 5. Basalekspresjonen for cathepsin B viste en økende tendens i prosessering av "single chain"- til "two chain"-form gjennom differensieringsperioden. Dette kan skyldes en samtidig økt legumainaktivitet, da legumain er vist å prosessere cathepsin B fra "single chain"- til "two chain" form [52, 60]. Stripping av membranen før inkubering med nye antistoffer kan ha påvirket resultatet for kvantifisering, da det kan tenkes at prøveproteiner i membranen fjernes i tillegg til tidligere brukte antistoffer. Aktiviteten av begge proteasene så ut til å øke under differensieringen, men denne økningen var ikke signifikant. Det er ikke mulig å sammenligne aktiviteten til de to proteasene direkte, da aktivitetsmålingene benyttet to ulike peptidsubstrater, som var spesifikke for den enkelte proteasen.

#### **4.4 Simvastatin påvirker cellenes morfologi og reduserer viabiliteten**

Statiner er vist å stanse hepatocytter i G0/G1 fasen i celledyklusen [92] og indusere apoptose *in vitro* [37, 44]. Apoptoseprosessen karakteriseres av veldefinerte morfologiske og biokjemiske forandringer, og statindusert apoptose er blant annet verifisert ved TUNEL-positive kjerner, aktivering av caspase-3 og -9 og translokalisering av Bax [37]. Det er også observert atrofi og strukturelle forandringer i mitokondriene i muskelbiopsier fra pasienter med statinindusert myopati [29]. I våre celleforsøk kunne vi observere morfologiske forandringer i form av redusert cellestørrelse og at muskelfibrene mistet noe av sin elongerte form. En stor andel av cellene løsnet fra brønnbunnen, noe som resulterte i at kontakten med nabocellene ble mindre. Samtidig inkubering med mevalonat så ut til å motvirke disse morfologiske forandringene ved at myotubene beholdt sin elongerte form. Den beskyttende effekten av mevalonat var derimot ikke gjeldende ved høye konsentrasjoner av simvastatin ( $\geq 40 \mu\text{M}$ ).

Reduksjonen i antall viable celler er vist å være avhengig av både statinkonsentrasjonen [37, 44] og den tiden cellene eksponeres for statin [37]. Potensialet de ulike statinkonsentrasjoner har til å redusere viabilitet varierer i litteraturen, og kan skyldes at det er benyttet ulike metoder for kvantifisering av viabilitet [37, 44]. Kwak et al. som benyttet MTS-assay fra samme produsent som ble benyttet i denne oppgaven, demonstrerte nylig en  $\text{IC}_{50}$ -verdi på  $5 \mu\text{M}$  simvastatin for celleviabilitet i differensierte myotuber og  $1 \mu\text{M}$  simvastatin for

differensierende myoblaster fra *M. vastus lateralis*. Dette til forskjell fra vår studie som viste en  $IC_{50}$ -verdi på 49  $\mu M$  i differensierte myotuber. Det er vanskelig å tenke seg at *in vitro* resultatene til Kwak et al. reflekterer hva som skjer *in vivo*, da dette ville medføre en høyere forekomst av muskelatrofi, og at atrofien muligens ville inntreffe raskere. En simvastatinkonsentrasjon på 1-5  $\mu M$  *in vitro* er en realistisk *in vivo*-konsentrasjon, da serumkonsentrasjoner av en administrert dose på 40 mg simvastatin ved CYP3A4-hemming kan komme opp i en konsentrasjon på 1,2  $\mu M$  [18]. Kwak et al. beskrev at den optiske målingen ble foretatt etter 4 timer [44], mens vi målte ved tiden 0,5, 1, 2, 3 og 4 timer i samsvar med produsentens anbefalinger. Vi valgte å fremstille dataene målt etter 2 timer da forskjellene i viabilitet (målt som omdannelse av MTS-reagens til formazan) var størst ved dette tidspunktet. Sammensetningen av dyrkningsmediene i nevnte studie skilte seg noe fra mediene vi har benyttet, men ellers var betingelsene de samme. Til tross for tilnærmet like betingelser og metode, skiller våre resultater seg fra de overnevnte. Forskjellene er vanskelig å forklare, men faktorer som lab-til-lab variasjoner, forsøksoppsett og donorspesifikke variasjoner kan påvirke. Viabilitetsforsøkene for både *M. obliquus internus abdominis* (friske buk-donorer) og *M. vastus lateralis* (syke lår-donorer) fra pasienter med påviste muskelbivirkninger viste en  $IC_{50}$ -verdi på tilnærmet 49  $\mu M$  simvastatin. Det ble observert en reduksjon på tilnærmet 20 % ved stimulering med 1-40  $\mu M$  simvastatin for de friske buk-donorene. Denne reduksjonen var imidlertid ikke gjeldende for de syke lår-donorene, som utviste tilnærmet ingen sensitivitet ovenfor simvastatin sammenlignet med de friske buk-donorene. Reduksjonen i viabilitet var signifikant først etter stimulering med 50  $\mu M$  simvastatin for begge donortypene. Våre resultater tyder på at 50  $\mu M$  simvastatin er en toksisk dose for myotubene, og det kan tenkes at en større andel av muskelcellene dør ved nekrose enn apoptose. Vi har ikke verifisert om reduksjonen i celleviabilitet skyldes apoptose eller nekrose. Apoptose kunne blant annet vært verifisert ved DNA-fragmentering og måling av caspase-aktivitet.

Resultatene for inkubering av mevalonat sammen med statin varierer også i litteraturen. Kwak et al. viste at det ved inkubering av 5  $\mu M$  simvastatin med eller uten 50  $\mu M$  mevalonat forelå tilnærmet ingen forskjell i celleviabilitet [44]. Sacher et al. viste derimot at selv en mevalonatkonsentrasjon på 10 mM ikke kunne forbedre reduksjonen i viabilitet forårsaket av 30  $\mu M$  simvastatin [37]. Det at mevalonat ikke opphever statineffekten i alle tilfellene, tyder på at statiner kan påvirke cellene på andre måter enn gjennom hemmingen av HMG-CoA-reduktase og redusert dannelselse av nedstrømsprodukter i mevalonatsynteseveien. Vi observerte

ingen signifikant endring i viabilitet ved inkubering av statin med mevalonat. Det forelå likevel en tendens til reversering ved inkubering av 1 mM mevalonat sammen med simvastatin hos buk-donorene, men antall forsøk er for lavt til å kunne dokumentere eventuelle signifikante forskjeller.

#### **4.5 Simvastatin med eller uten mevalonat hemmer uttrykk og aktivitet av legumain og cathepsin B**

Resultater fra *in vitro*-studier tyder på at statiner initierer apoptose gjennom den mitokondrielle signalveien, vist ved aktivering av caspase-3 og -9 [37], og økte nivåer av det proapoptotiske proteinet Bax som øker permeabiliteten til mitokondriene [44]. I blastocytter [68] og tumorer [55], hvor legumain foreligger i høy konsentrasjon eller er overuttrykt, har legumain vist å ha en beskyttende effekt mot apoptose. Mekanismen for den antiapoptotiske effekten av legumain i tumorer er foreslått i et "abstract" for en posterpresentasjon på "The 99th AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting" i 2008 [93]. Liu et al. beskriver en hypotese om at lysosompermeabiliteten endres i tidlig fase av apoptose, noe som resulterer i frigivelse av legumain til cytosol. Her beskytter legumain mot apoptose mediert via både den mitokondrielle signalveien og dødsreseptor-signalveien, ved inaktivering av henholdsvis caspase -7 og -9 eller caspase -8. I tillegg binder legumain direkte til cathepsin B og undertrykker autoaktiveringen av denne. Dette medfører blant annet en redusert aktivering av det proapoptotiske proteinet Bid. En hemmer av legumain fører til at kreftcellene går inn i apoptose både *in vitro* og *in vivo* (upubliserte data) [93]. Dette er svært interessante potensielle mekanismer, men hvordan legumain hemmer autoaktiveringen av procathepsin B til aktiv cathepsin B er ikke kjent, og som tidligere nevnt er det kun kjent at legumain prosesserer "single chain"- til "two chain"-form av cathepsin B [52, 60]. Det er heller ikke beskrevet at legumain kan inaktivere caspasene. Den antiapoptotiske effekten av legumain er også sett i upubliserte data fra vår forskningsgruppe (Robert Smith), der viabiliteten av legumainoveruttrykte celler (transfektete HEK-M38L) ikke reduseres i like stor grad ved stimulering med apoptoseinduserende stoffer (bafilomycin A1 og brefeldin A) og simvastatin (100 µM), sammenlignet med normale celler (HEK293) [94]. Videre har forskningsgruppen vist at ved differensiering av monocytter til makrofager ved stimulering med M-CSF ("macrophage colony stimulating factor") øker legumainaktiviteten kraftig. Ved inkubering med TNF $\alpha$ , som er et proinflammatorisk cytokin, skjer det imidlertid ingen endring i legumainaktiviteten. Disse resultatene kan tyde på at TNF $\alpha$  og inflammasjon har en

negativ innvirkning på legumainaktiviteten. Statinindusert myopati i form av myositt karakteriseres av inflammasjon i musklene, noe som kan tyde på at den pleiotrope antiinflammatoriske effekten av statiner vist i glatt muskel [95], muligens ikke er gjeldende for skjelettmuskel. Det er ikke kjent om de pleiotrope effektene av statiner er en klasseeffekt, om den er doseavhengig eller vevsspesifikk.

Teoretisk kan det tenkes at legumain også kan ha en antiapoptotisk effekt i skjelettmuskelceller ved statinindusert apoptose. Men da vi har vist at aktiviteten av legumain er forholdsvis lav i differensierte myotuber sammenlignet med nivået i legumainoveruttrykte celler, er det lite trolig at legumain kan utøve en slik effekt. Legumainaktiviteten i legumainoveruttrykte celler (HEK-M38L) ligger på  $\sim 600$  ( $\Delta F/\text{sekund}$ )/ $\mu\text{g}$  totalprotein, mens aktivitetsdataene som er generert i denne oppgaven maksimalt ligger på  $35$  ( $\Delta F/\text{sekund}$ )/ $\mu\text{g}$  totalprotein. Det er imidlertid vanskelig å sammenligne de to celltypene, da aktiviteten korreleres til mengde totalprotein og celletypene har ulik type og mengde proteininnhold. Totalprotein-nivået i skjelettmuskelceller vil blant annet være preget av et høyt innhold av aktin og myosin. En alternativ hypotese er at legumain har proapoptotisk effekt på bakgrunn av strukturlikhet med caspasene, og det er vist at legumain ved sur pH i likhet med caspasene kan spalte substrater med aspartat i P1-posisjon [51, 67]. Dette er hovedsakelig basert på data fra planter, og det er uvisst i hvor stor grad legumain spalter caspasesubstrater i pattedyr. For at legumain skal kunne utøve en eventuell apoptotisk eller antiapoptotisk effekt, må den lysosomale membranen permeabiliseres slik at legumain kan frigjøres til cytosol [49, 74-76]. Simvastatin er vist å øke mitokondrienes produksjon av oksidativt stress (ROS) [44], som bidrar til å destabilisere den lysosomale membranen. Det foreligger også en teori om at apoptosom, caspase-3, -7, og -9 kan trigge den lysosomale membranpermeabiliteten, noe som er aktuelt ved statinindusert apoptose. Da cathepsin B er vist å være involvert i apoptose [49, 69, 74-76] og genuttrykket av cathepsin B er rapportert å være overuttrykt ved muskelatrofi [69], er det naturlig å tenke at cathepsin B-aktiviteten øker ved statinindusert apoptose slik som for caspasene. Imidlertid er den antiaterosklerotiske effekten av atorvastatin vist ved å redusere cathepsin B-aktiviteten [96]. Tilsvarende har atorvastatin vist å nedregulere genuttrykket av legumain i monocytter fra pasienter under behandling [12].

Resultatene viste at økende konsentrasjoner av simvastatin så ut til å redusere proteinekspresjonen, samt redusere prosesseringen av proformen til aktiv form av legumain. Statineffekten på proteinekspresjonen av legumain var tilsvarende for både buk-donorene og

de syke lår-donorene. Det er vanskelig å si noe konkret om proteinekspresjonen av cathepsin B, da  $n=1$  og ekspresjonen av proformen i kontrollen mellom de to dose-respons-blottene ikke var samsvarende. Ut fra blottene så det imidlertid ut til at ekspresjonen av cathepsin B "single chain" (29 kDa) økte med økende konsentrasjoner av simvastatin, mens proformen (40 kDa) og "two chain" (25 kDa) formen ble redusert. Til tross for økende ekspresjon av den aktive formen på 29 kDa hadde simvastatin en hemmende effekt på cathepsin B-aktiviteten, i likhet med legumainaktiviteten. Reduksjonen i proteaseaktivitet skyldes ikke redusert celleviabilitet, da reduksjonen i aktivitet ble observert allerede ved lave konsentrasjoner av simvastatin (1-10  $\mu\text{M}$ ), mens reduksjonen i antall viable celler var signifikant først ved 50  $\mu\text{M}$  simvastatin. Den hemmende effekten av simvastatin på aktiviteten av cysteinproteasene var gjeldende for alle tre donortypene. Reduksjonen i aktivitet for legumain og cathepsin B var mest uttalt i henholdsvis de syke lår-donorene og buk-donorene.  $\text{IC}_{50}$ -verdien for legumain og cathepsin B var 18  $\mu\text{M}$  simvastatin for begge proteasene i buk-donorene, henholdsvis 15 og 13  $\mu\text{M}$  simvastatin i de syke lår-donorene, og 24 og 42  $\mu\text{M}$  simvastatin i de friske lår-donorene. Men aktivitetsforskjellene mellom donorene var likevel ikke signifikante. Ut fra rådataene for aktivitetsnivået i kontrollcellene, hadde de tre donorene ulike basalekspresjon av både legumain (lår-donor > buk-donor > syk lår-donor) og cathepsin B (lår-donor > syk lår-donor > buk-donor), men spredningen var stor. Enzymaktiviteten ble korrigert for mengden totalprotein i prøvene. For å unngå variasjoner i totalproteinmålingene ble inkubasjonstiden med fargereagenset holdt konstant. Det var liten variasjon i totalproteinkonsentrasjonene mellom parallelle forsøk, men stor variasjon mellom de ulike donortypene, der buk-donorene hadde høyere totalproteinkonsentrasjon enn lår-donorene. Anatomisk lokalisasjon og totalproteininnhold kan derfor tenkes å forklare forskjellene vi har observert i proteaseaktivitet mellom donortypene. Det at reduksjonen i proteaseaktivitet med økende konsentrasjoner av simvastatin ikke er signifikant sammenlignet med kontroll, kan forklares ved at antall forsøk er for lavt og at spredningen i aktiviteten er stor for enkelte konsentrasjoner av simvastatin. En stor spredning i data ved lave ekspresjonsnivåer, vil ha større innvirkning på sammenligningen enn om ekspresjonsnivået i utgangspunktet hadde vært høyere og mer robust. Selv om lineær regresjon er en enkel statistisk metode som kun forteller om stigningstallet til regresjonslinjen er signifikant forskjellig fra null, gir den her en god indikasjon på at proteaseaktiviteten reduseres med økende statinkonsentrasjoner. Det forelå ingen markante forskjeller mellom aktivitetsdata som ble generert etter simvastatinstimulering i 24 timer, sammenlignet med aktivitetsdata som ble generert etter stimulering i 48 timer for buk-donorene. Den toksiske effekten av 50  $\mu\text{M}$  simvastatin inntraff

raskt, fordi legumainaktiviteten ble redusert med 85 % etter 1 times stimulering sammenlignet med kontroll (resultatene er ikke vist, n=1).

Proteaseaktivitet reguleres av endogene hemmere, pH og redoks-potensialet til det cellulære kompartimentet proteasene befinner seg i. Cysteinproteasene kløyver hovedsakelig sine substrater ved reduserende og sure forhold i lysosomene (stor proteinomsetning), men de lysosomale cysteinproteasene er også vist å ha proteolytisk aktivitet ekstracellulært (spesifikk substrat-prosessering), ved oksiderende og nøytrale forhold [97]. Dersom de lysosomale proteasene frigjøres til cytosol ved statinindusert myotoksisitet, vil de møte en nøytral pH (7,2) [98]. Legumain er vist å være stabil i pH-intervallet 4,2-5,5, men har samtidig vist å ha maksimal aktivitet ved pH 6,4 [52]. Cathepsin B er i likhet med legumain, vist å være ustabil ved nøytral pH ved irreversibel inaktivering av aktivitet og tap av tredimensjonal struktur [97]. Det er vist at laktat/pyrovat-ratioen i serum er høyere hos pasienter som er behandlet med statiner enn ubehandlede pasienter med hyperlipidemi [99]. Samtidig er det vist økt laktat/pyrovat-ratio ved trening i statinbehandlede rotter [24]. Akkumulering av laktat i muskelen vil redusere pH i cytosol, noe som kan være gunstig for enzymaktiviteten av de lysosomale proteasene. Det er imidlertid ikke kjent hvor stor innvirkning laktat har på pH i muskel. I tillegg til inaktivering ved nøytral pH, kan det tenkes at den reduserte aktiviteten til legumain og cathepsin B ved statinbehandling skyldes en inaktivering mediert av ROS. Cytosol har i likhet med lysosomene et reduserende miljø, men redoks-balansen vil trolig forskyves ved statinindusert dannelse av ROS. ROS i form av  $H_2O_2$  er vist å inaktivere tiolgruppen (SH) i cystein i det katalytiske setet til cathepsin B, som medfører en irreversibel hemming av enzymaktiviteten [100, 101]. ROS er også vist å inaktivere caspasene, som også er cysteinproteaser, noe som har resultert i atypisk apoptose [101]. Vi vet ikke i hvor stor grad simvastatin og ROS påvirker permeabiliteten til den lysosomale membranen. Mengden legumain og cathepsin B som frigjøres til cytosol kan undersøkes ved subcellulær fraksjonering av myotubene. På bakgrunn av de overnevnte mulige mekanismene for inaktiveringen i cytosol, kan aktiviteten som er målt i denne oppgaven tenkes å være relatert til cysteinproteasene lokalisert i lysosomene.

Da inkubering av mevalonat med statin er vist å redusere aktiviteten til caspase -3 og -9 [37], kan det tenkes at mevalonat også hadde en tilsvarende effekt på legumain- og cathepsin B-aktivitet og -ekspresjon. Det ble ikke utført immunoblotting av cathepsin B på grunn av tidsnød. Proteinekspressjonen av både pro- og aktiv form av legumain var høyere i myotubene

stimulert med simvastatin sammen med mevalonat sammenlignet med stimulering med simvastatin alene. Høyere ekspresjon av aktiv form, ble imidlertid ikke gjenspeilet i aktiviteten, og de to behandlingene ga likt aktivitetsmønster. Da mevalonat ikke reverserer effekten av simvastatin på aktiviteten, kan dette tyde på at effekten av simvastatin her er uavhengig av hemmingen av HMG-CoA-reduktase. Som nevnt over kan transport ut av lysosomene, pH i cytosol og inaktivering av proteasene av reaktive oksygenforbindelser, påvirke aktiviteten. Vi kjenner ikke de intracellulære konsentrasjonene av verken simvastatin eller mevalonat, men resultatene indikerer at noe må bli tatt opp av cellene. Tanaka et al. benyttet liposomer for å frakte FPP og GGPP over plasmamembranen, da penetrasjonen viste seg å være dårlig [102]. FPP og GGPP er nedstrømsprodukter i mevalonatsynteseveien, og har høyere molekylvekt enn mevalonat [5, 40]. Det kan tenkes at den intracellulære konsentrasjonen av mevalonat ikke er tilstrekkelig høy nok til å beskytte fullstendig mot simvastatineffektene og at en høyere intracellulær konsentrasjon ville gitt ytterligere reversering av simvastatineffekten på proteinekspresjonen. Inkubering av mevalonat alene kan tenkes å ha en hemmende effekt på cellene, da rådataene for kontrollcellene inkubert med mevalonat alene viste lavere proteinekspresjon ved kvantifisering, og lavere enzymaktivitet sammenlignet med ustimulerte kontrollceller. Dette ble også observert for respirasjonsforsøkene. En eventuell preinkubering med mevalonat kan derfor tenkes å være toksisk for cellene.

Sekresjonen av legumain til det kondisjonerte mediet ble ikke påvirket av simvastatin før en konsentrasjon på 50  $\mu\text{M}$  var tilsatt, noe som resulterte i en reduksjon av sekresjonen. Dette kan skyldes 50 % reduksjon i viabilitet som ble observert ved denne statinkonsentrasjonen, og celledød ved apoptose eller nekrose. Det kan også tenkes at sekret legumain kan spille en rolle i normal muskelfunksjon. Høy dose av simvastatin (200  $\mu\text{M}$ ) er også vist å redusere sekresjonen av prolegumain fra legumainoveruttrykte celler (HEK-M38L, upubliserte data, Robert Smith).

## **4.6 Simvastatin påvirker mRNA-ekspresjonen**

Da vi har vist at simvastatin reduserer aktivitet, proteinekspresjon og prosessering til aktiv form av legumain og redusert aktivitet av cathepsin B, var det interessant å undersøke om denne reduksjonen skyldtes en hemming av mRNA-transkripsjonen. Da ekspresjonen av cathepsin L mRNA i likhet med cathepsin B er overuttrykt ved muskelatrofi [69], samt spiller

en rolle i apoptose [49, 74-77], og er et substrat for legumain [60], var det naturlig også å studere dette cathepsinet. Det foreligger ikke data på om statiner påvirker genekspressjonen av legumain eller cathepsinene i human skjelettmuskel, men statiner er vist å oppregulere cathepsin L mRNA i en dyremodell [103], mens legumain mRNA er vist og nedreguleres i monocytter hos pasienter under behandling med atorvastatin [12]. Da legumain viste lave proteinnivåer i cellemodellene våre og ble redusert av simvastatin, var det sannsynlig at genuttrykket av legumain også ble nedregulert, da det oftest er sammenheng mellom mengde mRNA og protein. Den mest potente endogene hemmeren av legumain, cystatin E/M [50], ble også inkludert i mRNA-analysen fordi det var interessant å studere om enzym/inhibitor-forholdet endret seg ved statinstimulering.

På grunn av for få forsøk er det vanskelig å kunne si noe sikkert om effekten av simvastatin på mRNA-ekspressjonen av de nevnte genene. Resultatene viste imidlertid en tendens til oppregulering av mRNA for cathepsin B og L. Dette kan stemme godt overens med de nevnte nivåene ved muskelatrofi, og at disse proteasene er kjent å være involvert i apoptose [49, 69, 74-76]. Den samme tendensen var gjeldende for cystatin E/M, og økt mengde cystatin E/M gir mindre aktive proteaser. Dersom nivået av legumain mRNA var uendret, kunne reduksjonen i legumainaktivitet derfor skyldes en oppregulering av cystatin E/M. Men mRNA-ekspressjonen av legumain viste i likhet med data som foreligger for monocytter [12], en tendens til lavere legumain mRNA-ekspressjon ved økende konsentrasjoner av simvastatin, noe som tyder på at simvastatin har en hemmende effekt på transkripsjonen av legumain mRNA og følgelig også redusert proteinekspressjon. Effekten av høye konsentrasjoner av simvastatin (30-50  $\mu$ M) på mRNA-ekspressjonen av legumain var større enn det som ble observert for proteinekspressjonen, og dette kan skyldes en langsom protein "turn-over". Halveringstiden til legumain er ikke kjent, og det kan være flere forhold som påvirker stabiliteten til proteinet.

#### **4.7 Simvastatin med eller uten mevalonat påvirker mitokondrie-respirasjonen**

Statiner er vist å påvirke flere sentrale aspekter ved mitokondriene og deres funksjon. Biopsier fra enkelte pasienter med statinindusert myopati har vist strukturelle forandringer i mitokondriene, noe som kan indikere mitokondriedysfunksjon [29]. Muskelbiopsiene som ble tatt fra pasientene med påviste muskelbivirkninger av atorvastatin, ble undersøkt ved



elektronmikroskopi og atrofi ble kun observert hos én av donorene. Én av donorene led av mitokondriopati, men strukturelle forandringer i mitokondriene er ikke kommentert og detaljene rundt observasjonene er ikke tilgjengelig. Som tidligere nevnt har *in vitro* studier vist at statiner initierer apoptose gjennom den mitokondrielle signalveien [37] og at økte Bax-nivåer øker permeabiliteten i mitokondriemembranen [44]. Det er også vist at statiner endrer mitokondriefunksjonen ved depolarisering av mitokondriemembranen, frigjøring av  $\text{Ca}^{2+}$ -ioner fra mitokondriene, økt produksjon av reaktive oksygenforbindelser (ROS) og endring i den mitokondrielle respirasjonen [41, 44, 46, 47]. Reduksjonen i respirasjonen i disse studiene er vist ved signifikant reduksjon i oksygenforbruk ved stimulering med fettsyrer og adenosindifosfat (ADP). Mekanismene for endringene i den mitokondrielle respirasjonen er ikke fullstendig kartlagt, men en mulig forklaring kan være at statiner hemmer en eller flere av kompleksene i elektrontransportkjeden direkte. Elektrontransportkjeden (respirasjonskjeden) i den indre mitokondriemembranen består blant annet av fire enzymkomplekser (I-IV), og transport av elektroner mellom enzymkompleksene resulterer i en reduksjon av oksygen til vann og produksjon av energi i form av adenosintrifosfat (ATP) fra adenosindifosfat (ADP) [104]. Det er foreløpig vist at simvastatin hemmer kompleks I i elektrontransportkjeden ved tilnærmet fysiologiske konsentrasjoner (5  $\mu\text{M}$ ) [44]. Hemmingen av kompleks I ble verifisert ved tilsetning av substrat for kompleks II, som ikke ga en reduksjon i oksygenforbrenning. En hemming av kompleks I kan hypotetisk være årsaken til økt dannelse av ROS [44].

Resultatene våre bekrefter at den mitokondrielle respirasjonen reduseres i form av redusert  $\text{CO}_2$ -produksjon ved glukoseoksidasjon, og et redusert glukoseopptak med økende konsentrasjoner av statin. Reduksjonen i glukoseoksidasjonen var signifikant for alle konsentrasjonene av simvastatin for donorene fra *M. obliquus internus abdominis*, men ikke for donorene fra *M. vastus lateralis*. Stimulering med FCCP gir et mål på den maksimale oksidasjonskapasiteten til mitokondriene, ved at FCCP inhiberer koblingen mellom elektrontransportkjeden og fosforylering av ADP. Oksidasjonskapasiteten viste en tendens til reduksjon med økende konsentrasjoner av simvastatin. Reduksjonen var ikke signifikant, noe den heller ikke var i de overnevnte studiene. Mevalonat viste en tendens, men ikke signifikant reversering i endringen av glukoseoksidasjon ved statinstimulering med unntak av behandling med 10  $\mu\text{M}$  simvastatin for muskeldonorene fra *M. obliquus internus abdominis*. Kontrollcellene som var inkubert med mevalonat alene viste lavere nivåer av glukoseoksidering enn de ubehandlede kontrollcellene. Som nevnt over, kan dette tyde på at

mevalonat i seg selv kan ha en hemmende effekt på glukoseoksideringen. Da vi undersøker flere endepunkter i observasjonene er den statistiske sammenligningen Bonferroni-korrigert for å unngå falske positive funn. Flere av simvastatin- og mevalonateffektene var statistisk signifikante uten denne korreksjonen. Upubliserte data fra forskningsgruppen (Robert Smith) har vist at inkubering av statin sammen med rotenon, som hemmer kompleks I, ga en ytterligere reduksjon i glukoseoksidasjonen sammenlignet med simvastatinstimulering alene. Denne reduksjonen ble reversert ved samtidig inkubering med geranylgeranylpyrofosfat (GGPP), men ikke farnesylpyrofosfat (FPP). Disse dataene tyder også på at kompleks I i respirasjonsskjeden påvirkes av statiner, og at mangel på isoprenoiden GGPP påvirker mitokondriefunksjonen.

## 5 Konklusjon

- Legumain ble for første gang detektert i primære humane skjelettmuskelceller både i myoblaster og i ferdig differensierte myotuber. Både ekspresjonen og aktiviteten av legumain økte under differensieringen.
- Simvastatin reduserte celleviabiliteten ( $IC_{50} \approx 49 \mu M$ ) og påvirket myotubenes morfologi.
- Simvastatin ga en doseavhengig reduksjon i aktivitet av legumain og cathepsin B. Den kalkulererte konsentrasjonen som hemmet halve enzymaktiviteten ( $IC_{50}$ ) var henholdsvis 15-24  $\mu M$  og 13-42  $\mu M$  simvastatin, avhengig av donor-type.
- Simvastatin reduserte både mRNA- og proteinuttrykket av legumain.
- Genuttrykket (mRNA) av cathepsin B og L ble oppregulert av simvastatinstimulering.
- Simvastatin reduserte den mitokondrielle respirasjonen i myotuber.
- Mevalonat viste tendens til å reversere de statininduserte effektene på celleviabilitet, de lysosomale proteasene og den mitokondrielle respirasjonen – noe som kan tyde på at statinindusert myotoksisitet kan skyldes effekter bare delvis forårsaket av hemmingen av HMG-CoA-reduktase.
- Det var ingen signifikante forskjeller i responsene etter simvastatinstimulering av myotuber fra friske buk-donorers sammenlignet med myotuber fra lår-donorers med muskelbivirkninger av atorvastatin.
- Flere studier er nødvendig for å kartlegge om og hvordan legumain og/eller cathepsin B deltar i mekanismen for statinindusert myotoksisitet.

## Veien videre

For å kunne si noe om effekten av simvastatin på mRNA-ekspresjon, må det utføres flere forsøk. Det kan også være gunstig å utføre en fullstendig dose-respons for deteksjon av aktivitet og proteinekspresjon innad i ett forsøk, for å redusere variasjonen i resultatene. For videre å kunne si noe om mekanismen simvastatin har på proteasene, kan det være aktuelt å utføre et tidsforsøk for minst en av konsentrasjonene (for eksempel 20  $\mu\text{M}$ ) samt subcellulær fraksjonering for å verifisere en eventuell transport av de lysosomale proteasene ut i cytosol. Eventuelt kunne det vært aktuelt å studere evnen simvastatin har til å destabilisere den lysosomale membranen ved bruk av en lysosomotrop base som akkumulerer i lysosomene, og som avgir fluorescens da den frigjøres til cytosol. Det kunne også vært interessant å studere aktivitet og ekspresjon i legumain-transfekterte primære humane skjelettmuskelceller, men dette vil kreve konstruksjon av cDNA i virusvektorer, kreve "biosafety level" 2 (BSL-2) på laboratoriet og være svært tidkrevende. Eventuelle "knockdown"-studier ved bruk av siRNA ("small interfering" RNA) mot legumain er også en mulighet. Det vil også være interessant å studere evnen ROS ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) har til å hemme legumainaktivitet, samt studere mengden ROS som dannes ved simvastatinstimulering av myotubene. Verifisering av apoptose kan også være aktuelt.

Det vil være naturlig å benytte de friske buk-donorene i videre studier. Dataene generert fra de syke lår-donorene kan ikke publiseres, da det i sin tid ikke ble sendt søknad til Regional Etisk Komité (REK) for opprettelse av biobank. Satelittcellene fra de friske lår-donorene ble isolert allerede i år 2000, og det er 12 år senere vanskelig å få disse til å vokse, samt bli konfluente.

# Litteraturliste

1. Herfindal, E.T. and D.R. Gourley, *Textbook of therapeutics, Drug and disease management*. 6th ed1996.
2. Rang, H.P., et al., *Pharmacology*. 7th ed2011.
3. Helsedirektoratet, *Nasjonale retningslinjer for primærforebygging av hjerte- og karsykdommer*, 2009.
4. Pedersen, T.R., et al., *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)*. *Atherosclerosis Supplements*, 2004. **5**(3): p. 81-87.
5. Abd, T.T. and T.A. Jacobson, *Statin-induced myopathy: a review and update*. *Expert Opinion on Drug Safety*, 2011. **10**(3): p. 373-387.
6. Eriksen, E., *Henvendelse Reseptregisteret*, 2012.
7. Folkehelseinstituttet. *Legemiddelforbruket i Norge*. 2012; Available from: [www.legemiddelforbruk.no](http://www.legemiddelforbruk.no).
8. Folkehelseinstituttet. *Reseptregisteret*. 2012; Available from: [www.reseptregisteret.no](http://www.reseptregisteret.no).
9. Raban Jeger, T.D., *Statins: have we found the Holy Grail?* *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13515.
10. CholesterolTreatmentTrialists'Collaboration, *Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials*. *The Lancet*, 2010. **376**(9753): p. 1670-1681.
11. Kong, W. and Y. Zhu, *The Pleiotropic Effects of Statins in the Prevention of Atherosclerosis*. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 2012. **26**(1): p. 5-7.
12. Wang, Z.-h., et al., *Pleiotropic Effects of Atorvastatin on Monocytes in Atherosclerotic Patients*. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2010. **50**(3): p. 311-319.
13. Skottheim, I.B., et al., *Statin induced myotoxicity: The lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008. **33**(4-5): p. 317-325.
14. Backman, J.T., et al., *Plasma concentrations of active simvastatin acid are increased by gemfibrozil[ast]*. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. **68**(2): p. 122-129.
15. Kearney, A.S., et al., *The Interconversion Kinetics, Equilibrium, and Solubilities of the Lactone and Hydroxyacid Forms of the HMG-CoA Reductase Inhibitor, CI-981*. *Pharmaceutical Research*, 1993. **10**(10): p. 1461-1465.
16. Sakaeda, T., et al., *Effects of acid and lactone forms of eight HMG-CoA reductase inhibitors on CYP-mediated metabolism and MDR1-mediated transport*. *Pharmaceutical Research*, 2006. **23**(3): p. 506-512.
17. Molden, E. and A. Åsberg, *Metabolismeinteraksjoner med statiner*. *Tidsskriftet for Den norske legeförening*, 2001. **Nr. 2**.
18. Bellosta, S., R. Paoletti, and A. Corsini, *Safety of statins: Focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions*. *Circulation*, 2004. **109**(23 SUPPL.): p. III50-III57.
19. Silva, M.A., et al., *Statin-related adverse events: A meta-analysis*. *Clinical Therapeutics*, 2006. **28**(1): p. 26-35.
20. Skottheim, I.B., M.P. Bogsrud, and A. Åsberg, *Muskelbivirkninger av statiner - hva vet vi om mekanismer og hvordan diagnostiseres de?* *Norsk Farmaceutisk Tidsskrift*, vol 7, 22-25, 2010.
21. Evans, M. and A. Rees, *Effects of HMG-CoA Reductase Inhibitors on Skeletal Muscle: Are all Statins the Same?* *Drug Safety*, 2002. **25**(9): p. 649-663.

22. Westwood, F.R., et al., *Statin-Induced Muscle Necrosis in the Rat: Distribution, Development, and Fibre Selectivity*. Toxicologic Pathology, 2005. **33**(2): p. 246-257.
23. Obayashi, H., et al., *Cerivastatin induces type-I fiber-, not type-II fiber-, predominant muscular toxicity in the young male F344 rats*. The Journal of Toxicological Sciences, 2011. **36**(4): p. 445-452.
24. Seachrist, J.L., et al., *Roles of Exercise and Pharmacokinetics in Cerivastatin-Induced Skeletal Muscle Toxicity*. Toxicological Sciences, 2005. **88**(2): p. 551-561.
25. Di Stasi, S.L., et al., *Effects of Statins on Skeletal Muscle: A Perspective for Physical Therapists*. Physical Therapy, 2010. **90**(10): p. 1530-1542.
26. Members:, W.C., et al., *ACC/AHA/NHLBI Clinical Advisory on the Use and Safety of Statins*. Stroke, 2002. **33**(9): p. 2337-2341.
27. Sinzinger, H., R. Wolfram, and B. Peskar, *Muscular Side Effects of Statins*. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2002. **40**: p. 163-171.
28. Blaier, O., M. Lishner, and A. Elis, *Managing statin-induced muscle toxicity in a lipid clinic*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 2011. **36**(3): p. 336-341.
29. Baer, A.N. and R.L. Wortmann, *Myotoxicity associated with lipid-lowering drugs*. Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**(1): p. 67-73.
30. Sakaeda, T., K. Kadoyama, and Y. Okuno, *Statin-Associated Muscular and Renal Adverse Events: Data Mining of the Public Version of the FDA Adverse Event Reporting System*. PLoS ONE, 2011. **6**(12): p. e28124.
31. Backes, J.M., et al., *Does Simvastatin Cause More Myotoxicity Compared with Other Statins?* The Annals of Pharmacotherapy, 2009. **43**(12): p. 2012-2020.
32. Tomaszewski, M., et al., *Statin-induced myopathies*. Pharmacological Reports, 2011. **63**(4): p. 859-866.
33. Davidson, M.H., *Controversy surrounding the safety of cerivastatin*. Expert Opinion on Drug Safety, 2002. **1**(3): p. 207-212.
34. Hermann, M., H. Christensen, and J.L.E. Reubsæet, *Determination of atorvastatin and metabolites in human plasma with solid-phase extraction followed by LC–tandem MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **382**(5): p. 1242-1249.
35. Guis, S., et al., *In vivo and in vitro characterization of skeletal muscle metabolism in patients with statin-induced adverse effects*. Arthritis Care & Research, 2006. **55**(4): p. 551-557.
36. Vladutiu, G.D., et al., *Genetic risk factors associated with lipid-lowering drug-induced myopathies*. Muscle & Nerve, 2006. **34**(2): p. 153-162.
37. Sacher, J., et al., *Delineation of Myotoxicity Induced by 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reductase Inhibitors in Human Skeletal Muscle Cells*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005. **314**(3): p. 1032-1041.
38. Corpataux, J.M., et al., *The Effect of Six Different Statins on the Proliferation, Migration, and Invasion of Human Smooth Muscle Cells*. Journal of Surgical Research, 2005. **129**(1): p. 52-56.
39. Sirvent, P., J. Mercier, and A. Lacampagne, *New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity*. Current Opinion in Pharmacology, 2008. **8**(3): p. 333-338.
40. Baker, S.K., *Molecular clues into the pathogenesis of statin-mediated muscle toxicity*. Muscle & Nerve, 2005. **31**(5): p. 572-580.
41. Sirvent, P., et al., *Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca<sup>2+</sup> signaling alteration in skeletal muscle*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **329**(3): p. 1067-1075.
42. Elmore, S., *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*. Toxicologic Pathology, 2007. **35**: p. 495-516.

43. Dirks, A.J. and K.M. Jones, *Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2006. **291**(6): p. C1208-C1212.
44. Kwak, H.-B., et al., *Simvastatin impairs ADP-stimulated respiration and increases mitochondrial oxidative stress in primary human skeletal myotubes*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **52**(1): p. 198-207.
45. Nishimoto, T., et al., *Comparing myotoxic effects of squalene synthase inhibitor, T-91485, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes*. Biochemical Pharmacology, 2003. **66**(11): p. 2133-2139.
46. Sirvent, P., et al., *Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **338**(3): p. 1426-1434.
47. Kaufmann, P., et al., *Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(19-20): p. 2415-25.
48. Kobayashi, M., et al., *Preventive effects of bicarbonate on cerivastatin-induced apoptosis*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **341**(1-2): p. 181-188.
49. Chwieralski, C., T. Welte, and F. Bühling, *Cathepsin-regulated apoptosis*. Apoptosis, 2006. **11**(2): p. 143-149.
50. Rawlings, N.D., A.J. Barrett, and A. Bateman. *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors*. 2012; Available from: <http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>.
51. Chen, J.-M., et al., *Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases*. FEBS Letters, 1998. **441**(3): p. 361-365.
52. Chen, J.-M., et al., *Cloning, Isolation, and Characterization of Mammalian Legumain, an Asparaginyl Endopeptidase*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(12): p. 8090-8098.
53. Ishizaki, T., et al., *The asparaginyl endopeptidase legumain after experimental stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2010. **30**(10): p. 1756-1766.
54. Wu, W., et al., *Targeting Cell-Impermeable Prodrug Activation to Tumor Microenvironment Eradicates Multiple Drug-Resistant Neoplasms*. Cancer Research, 2006. **66**(2): p. 970-980.
55. Liu, C., et al., *Overexpression of Legumain in Tumors Is Significant for Invasion/Metastasis and a Candidate Enzymatic Target for Prodrug Therapy*. Cancer Research, 2003. **63**(11): p. 2957-2964.
56. Chen, J.-M., et al., *Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase*. Biochemical Journal, 1998. **355**: p. 111-117.
57. Ishidoh, K. and E. Kominami, *Processing and Activation of Lysosomal Proteinases*. Biological Chemistry, 2002. **383**: p. 1827-1831.
58. Li, D.N., et al., *Multistep Autoactivation of Asparaginyl Endopeptidase in Vitro and in Vivo*. The Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(40): p. 38980-38990.
59. Morita, Y., et al., *Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells*. FEBS Letters, 2007. **581**(7): p. 1417-1424.
60. Shirahama-Noda, K., et al., *Biosynthetic Processing of Cathepsins and Lysosomal Degradation Are Abolished in Asparaginyl Endopeptidase-deficient Mice*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(35): p. 33194-33199.
61. Sarandeses, C.S., et al., *Prothymosin  $\alpha$  Is Processed to Thymosin  $\alpha$ 1 and Thymosin  $\alpha$ 11 by a Lysosomal Asparaginyl Endopeptidase*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(15): p. 13286-13293.

62. Miller, G., et al., *Asparagine endopeptidase is required for normal kidney physiology and homeostasis*. The FASEB Journal, 2011. **25**(5): p. 1606-1617.
63. Choi, S.J., et al., *Identification of Human Asparaginyl Endopeptidase (Legumain) as an Inhibitor of Osteoclast Formation and Bone Resorption*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(39): p. 27747-27753.
64. Manoury, B., et al., *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 695-699.
65. Papaspyridonos, M., et al., *Novel Candidate Genes in Unstable Areas of Human Atherosclerotic Plaques*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006. **26**(8): p. 1837-1844.
66. Alvarez-Fernandez, M., et al., *Inhibition of Mammalian Legumain by Some Cystatins Is Due to a Novel Second Reactive Site*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(27): p. 19195-19203.
67. Bonneau, L., et al., *What happened to plant caspases?* Journal of Experimental Botany, 2008. **59**(3): p. 491-499.
68. Wu, B., et al., *Blastocystis Legumain Is Localized on the Cell Surface, and Specific Inhibition of Its Activity Implicates a Pro-survival Role for the Enzyme*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(3): p. 1790-1798.
69. Bechet, D., et al., *Lysosomal proteolysis in skeletal muscle*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005. **37**(10): p. 2098-2114.
70. Mohamed, M.M. and B.F. Sloane, *Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 764-775.
71. Turk, V., et al., *Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 2012. **1824**(1): p. 68-88.
72. Lutgens, S.P.M., et al., *Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease*. The FASEB Journal, 2007. **21**(12): p. 3029-3041.
73. Sandri, M., *New findings of lysosomal proteolysis in skeletal muscle*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(3): p. 223-9.
74. Oberle, C., et al., *Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes*. Cell Death Differ, 2010. **17**(7): p. 1167-1178.
75. Repnik, U. and B. Turk, *Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death*. Mitochondrion, 2010. **10**(6): p. 662-669.
76. Stoka, V., V. Turk, and B. Turk, *Lysosomal cysteine cathepsins: Signaling pathways in apoptosis*. Biological Chemistry, 2007. **388**(6): p. 555-560.
77. Repnik, U., et al., *Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics, 2012. **1824**(1): p. 22-33.
78. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. APMIS, 2001. **109**(11): p. 735-744.
79. Gaster M, Beck-Nielsen H, and Schrøder HD, *Proliferation conditions for human satellite cells. The fractional content of satellite cells*. APMIS, 2001. **109**(11): p. 726-34.
80. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
81. Johansen, H.T., C.G. Knight, and A.J. Barrett, *Colorimetric and Fluorimetric Microplate Assays for Legumain and a Staining Reaction for Detection of the Enzyme after Electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 1999. **273**(2): p. 278-283.



82. Barrett, A.J. and H. Kirschke, *Cathepsin-B, cathepsin-H, and cathepsin-L*. Methods in Enzymology, 1981. **80**: p. 535-561.
83. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. Journal of Lipid Research, 2007. **48**(4): p. 961-967.
84. Thornell, L.E., *Sarcopenic obesity: satellite cells in the aging muscle*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2011. **14**(1): p. 22-7.
85. Morgan, J.E. and T.A. Partridge, *Muscle satellite cells*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2003. **35**(8): p. 1151-1156.
86. Palacios, D. and P.L. Puri, *The epigenetic network regulating muscle development and regeneration*. Journal of Cellular Physiology, 2006. **207**(1): p. 1-11.
87. Jackman, R.W. and S.C. Kandarian, *The molecular basis of skeletal muscle atrophy*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2004. **287**(4): p. C834-C843.
88. Woollen, B.H., et al., *Determination of mevalonic acid in human urine as mevalonic acid lactone by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. **760**(1): p. 179-84.
89. Hoel, K., *In vitro undersøkelse av statinindusert muskeltoksisitet (Universitetet i Oslo)*, 2008: [www.duo.uio.no](http://www.duo.uio.no).
90. Zuzarte-Luis, V., et al., *Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death*. Developmental Biology, 2007. **301**(1): p. 205-217.
91. Towatari, T. and N. Katunuma, *Selective Cleavage of Peptide Bonds by Cathepsins L and B from Rat Liver*. Journal of Biochemistry, 1983. **93**(4): p. 1119-1128.
92. Sutter, A.P., et al., *Cell cycle arrest and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma cells by HMG-CoA reductase inhibitors. Synergistic antiproliferative action with ligands of the peripheral benzodiazepine receptor*. Journal of Hepatology, 2005. **43**(5): p. 808-816.
93. Liu, Y., et al., *Catalytic inactivation of capases by legumain confers resistance to multiple apoptotic pathways*, in 99th AACR Annual Meeting 2008: San Diego, CA.
94. Smith, R., et al., *Legumain activity and processing are regulated by cystatin E/M both intra- and extracellularly* Biochimie (submitted), 2012.
95. Quist-Paulsen, P., *Statins and inflammation: an update*. Current Opinion in Cardiology, 2010. **25** (4).
96. Kim, D.E., et al., *Molecular imaging of cathepsin B proteolytic enzyme activity reflects the inflammatory component of atherosclerotic pathology and can quantitatively demonstrate the antiatherosclerotic therapeutic effects of atorvastatin and glucosamine*. Mol Imaging, 2009. **8**(5): p. 291-301.
97. Jordans, S., et al., *Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions*. BMC Biochemistry, 2009. **10**(1): p. 23.
98. Oriij, R., et al., *In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in Saccharomyces cerevisiae reveals a relation between intracellular pH and growth*. Microbiology, 2009. **155**(1): p. 268-278.
99. De Pinieux, G., et al., *Lipid-lowering drugs and mitochondrial function: effects of HMG-CoA reductase inhibitors on serum ubiquinone and blood lactate/pyruvate ratio*. Br J Clin Pharmacol, 1996. **42**(3): p. 333-7.
100. Mirkovic, B., et al., *Redox-based inactivation of cysteine cathepsins by compounds containing the 4-aminophenol moiety*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27197.
101. Suto, D., et al., *Inactivation of cysteine and serine proteases by singlet oxygen*. Arch Biochem Biophys, 2007. **461**(2): p. 151-8.
102. Tanaka, T., et al., *Geranylgeranyl-Pyrophosphate, an Isoprenoid of Mevalonate Cascade, Is a Critical Compound for Rat Primary Cultured Cortical Neurons to*

- Protect the Cell Death Induced by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase Inhibition*. The Journal of Neuroscience, 2000. **20**(8): p. 2852-2859.
103. Mallinson, J.E., et al., *Blunted Akt/FOXO signalling and activation of genes controlling atrophy and fuel use in statin myopathy*. The Journal of Physiology, 2009. **587**(1): p. 219-230.
104. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4 ed 2005.

# Appendiks

## LØSNINGER

### 1. Celledyrking

---

#### 1.1 Utsåingsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I  
50 ml FCS (Føtalt kalveserum)  
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml  
2,5 ml Fungizone

#### 1.2 Ekstracellulær matriks (ECM)

1 ml fortynnet ECM (5ml ECM-gel i 70 ml utsåingsmedium)  
4 ml utsåingsmedium

#### 1.3 Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I  
10 ml FCS (Føtalt kalveserum)  
10 ml Ultroser G  
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml  
2,5 ml Fungizone

#### 1.4 Differensieringsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-I  
10 ml FCS (Føtalt kalveserum)  
2,5 ml Pen/ Strep 10.000 enheter/ml  
2,5 ml Fungizone  
25 pmol insulin

#### 1.5 1 x PBS

0,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
6 g Natriumcitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )  
8 g NaCl  
Ad 1,0 l dH<sub>2</sub>O

#### 1.6 Lysisbuffer (pH 5,8)

100 mM Natriumcitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )  
1 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
1 % (w/v) N-oktyl- $\beta$ -D-glukopyranosid

## 2. Totalproteinmåling

---

### 2.1 Fortynnet fargereagens (1:5)

10 ml Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate  
40 ml dH<sub>2</sub>O

## 3. Enzymaktivitetsmåling

---

### 3.1 Legumain-assaybuffer (pH 5,8)

39,5 mM Sitronsyre (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)  
121 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O  
1 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
0,01 % CHAPS  
1 mM DTT (tilsettes rett før bruk)

### 3.2 Legumain substratløsning (34 µM)

200 µl 2,5 mM Z-Ala-Ala-Asn-NHMec (løst i DMSO)  
14,5 ml Legumain-assaybuffer

### 3.3 Cathepsin B assaybuffer (pH 5,5)

200 mM Natriumacetat (NaC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O)  
4 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
8 mM DTT (tilsettes rett før bruk)

### 3.4 Cathepsin B substratløsning (68 µM)

2 ml 1 mM Z-Arg-Arg-AMC (løst i DMSO)  
27,4 ml dH<sub>2</sub>O

## 4. Immunoblotting (Westernblotting)

---

### 4.1 LDS-prøvebuffer

13 µl dH<sub>2</sub>O  
4,5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)  
2 µl 0,5 M DTT

### 4.2 10 x T-TBS (pH 7,5)

2,42 g Tris (base)  
11,68 g NaCl  
1 ml Tween 20  
Ad 2 l dH<sub>2</sub>O

### **4.3 Elektroforesebuffer**

40 ml NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)

Ad 800 ml dH<sub>2</sub>O

500 µl NuPAGE® Antioxidant (Tilsettes i elektroforesekaret mellom gelene)

### **4.4 Blottebuffer**

12 g Tris (base)

58 g Glysin

800 ml Metanol

Ad 4 l dH<sub>2</sub>O

### **4.5 Blotto**

10 g fettfri tørrmelk

20 ml 10 x T-TBS

Ad 200 ml dH<sub>2</sub>O

### **4.6 Fremkallingsløsning**

120 ml Kodak X-Ray developer

280 ml H<sub>2</sub>O

### **4.7 Fikseringsløsning**

120 ml Kodak X-Ray fixer

280 ml H<sub>2</sub>O

## **5. “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA)**

---

### **5.1 Vaskebuffer**

0,5 ml Tween

1 l PBS

## **6. RT-real-time-PCR**

---

### **6.1 Reaksjonsmedium til cDNA syntese**

x µl RNA-prøve (2 µg total-RNA)

ad 13,2 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O

2 µl 10xRTbuffer

0,8 µl 25X dNTP mix (100mM)

2 µl 10X Random Primers

1 µl RNase inhibitor

1 µl Multiscribe Reverse Transcriptase

**6.2 Miks til PCR-reaksjonen (per prøve)**

2,5 µl fortynnet cDNA prøve  
12,5 µl 2 x SYBR Green Master Mix  
0,25 µl 30 µM Primer F (forward)  
0,25 µl 30 µM Primer R (reverse)  
9,5 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O

**7. Substrat-oksidasjonsmetoden**

---

**7.1 Preløsning**

29,6 µl 0,2 mM (0,58 µCi/ml) \*U-glukose  
21,3 µl 10 µM BSA  
5049,1 µl DPBS m/ HEPES (pH 7,2)

**7.2 Akuttmedium med radiomerket glukose uten FCCP**

2550 µl preløsning  
0,26 µl DMSO

**7.3 Akuttmedium med radiomerket glukose med FCCP**

2550 µl preløsning  
0,26 µl 10 mM FCCP

**PROSEDYRE****8. Acetonfelling av proteinprøver til immunoblotting**

---

1. Beregn mengde cellelysat som inneholder 12 µg protein (eventuelt 6 eller 3 µg), og tilsett til nye merkede eppendorfrør.
2. Tilsett 4 ganger så stor mengde iskald 100 % aceton og vortex.
3. Inkuber blandingen i 1 time ved - 20 °C i fryseren.
4. Sentrifuger i 20 minutter ved 15 000 g ved 4 °C, og sug av supernatanten forsiktig.
5. Vask med 1 ml iskald aceton.
6. Sentrifuger i 10 minutter ved 15 000 g ved 4 °C, og sug av supernatanten forsiktig.
7. Proteinpelleten tørkes ved romtemperatur i 20-30 minutter.

## POSTER

### 9. Poster

---

**Sted:** Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi (NSFT) Vintermøte.  
**Tid:** 26.-29. januar, 2012.  
**Kategori:** Basalfarmakologi.  
**Tittel:** ” Are the cysteine proteases legumain and cathepsins involved in statin-induced myotoxicity?”  
**Poster:** Neste side.



## Are the cysteine proteases legumain and cathepsins involved in statin-induced myotoxicity?

JACOBSEN LL, SMITH R, THORESEN GH, SOLBERG R, JOHANSEN HT

Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo, PO Box 106S Blindern, 0136 Oslo, lhmj@student.farmasi.uio.no

### INTRODUCTION

Statins (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors) are widely prescribed drugs used to treat hypercholesterolemia and to reduce cardiovascular events. Statins are generally well tolerated, but are known to induce myotoxicity in skeletal muscle, ranging from mild myopathy to serious rhabdomyolysis. Simvastatin has the highest incidence of myotoxicity compared to the other statins and the statin lactone forms have higher myotoxic potential than their respective acid forms. The mechanism of statin-induced myotoxicity is not yet fully understood and several hypotheses have been proposed. One hypothesis is that statins induce apoptosis through the activation of calpain, caspase 3 and 9. In this study, expression, secretion and activity of other cysteine proteases (legumain and cathepsins) are investigated in primary human skeletal muscle cells after treatment with simvastatin *in vitro*.

### METHODS

As model systems, primary human skeletal muscle cells isolated from *M. obliquus internus abdominis* (LD) from healthy donors (LD, living donors) and *M. vastus lateralis* from patients, who experienced myotoxic symptoms after treatment with atorvastatin (AMD, atorvastatin muscle donors), have been used. Satellite cells (50 000/well) were cultured, proliferated and differentiated for 14 days before any measurements were done. Treatment with simvastatin lactone (SL) were performed the last 24-48 hours of differentiation. The proteases were analyzed by immunoblotting, ELISA, and enzyme activity measurements using specific fluorogenic peptide substrates (legumain; Z-Ala-Ala-Asn-NHMe, cathepsin B; Z-Arg-Arg-NHMe), and cell viability was analyzed by MTS-measurements.

### RESULTS

#### Increased expressions and activities of legumain and cathepsin B during myotube differentiation

- The expression of both active legumain (36 kDa) and cathepsin B (25 and 29 kDa) increased during differentiation of myotubes (Fig 1A).
- Both legumain and cathepsin B activities are increased during the period of differentiation (Fig 1B).

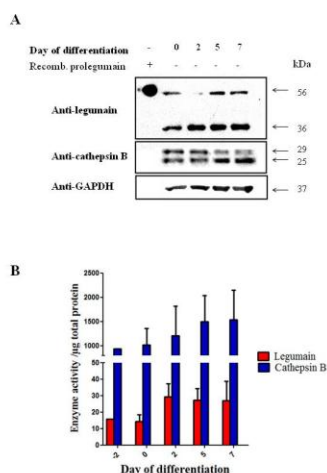


Figure 1. Expressions and activities of legumain and cathepsin B during differentiation of satellite cells towards myotubes

Cells were harvested at indicated time points and analyzed by immunoblotting (A) and protease activity measurements (B) (n=3-4).

#### Simvastatin changes morphology and inhibits protease activities and expressions in primary human myotubes

- Changes in morphology after simvastatin treatment were visible after 48 hours, and the myotubes appeared atrophied and less dense. Coadministration with mevalonolactone seemed to reverse some of the changes (Fig. 2).
- Primary human myotubes underwent a dose-dependent decrease in legumain and cathepsin B activities when exposed to increasing concentration of simvastatin (Fig. 3A).
- Immunoblotting showed a decrease in the expression of active legumain with increasing concentration of simvastatin (Fig. 3B).
- Primary human myotubes secreted legumain in the range of 750-2500 pg/ml (not shown).

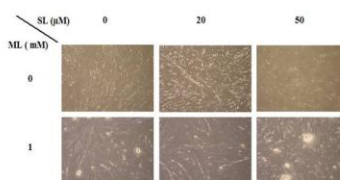


Figure 2. Morphological changes of simvastatin (SL)-treated myotubes +/- mevalonolactone (ML)

Primary human skeletal myotubes were treated with 20 or 50 µM SL +/- 1 mM ML for 48 hours. Control myotubes were treated with 0.1 % DMSO. Changes in morphology were also visible after 24 hours. Morphology was viewed at 4x magnification.

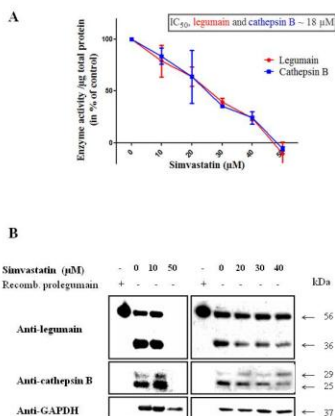


Figure 3. Regulation of legumain and cathepsin B activities (A) and expressions (B) in human myotubes (LD) when exposed to increasing concentrations of simvastatin.

Primary human myotubes (LD) were preincubated with 0-50 µM simvastatin lactone for 24 hours. Activities of legumain and cathepsin B were measured with peptide substrates as described (A). Immunoblotting of cell lysates was performed using legumain and cathepsin B specific antibodies (B) (n=3).

#### Simvastatin reduces the viability of primary myotubes

- The viability of primary human myotubes isolated from *M. obliquus internus abdominis* (LD) were more reduced after simvastatin treatment than the viability of myotubes isolated from *M. vastus lateralis* (AMD).
- 50 µM simvastatin reduced the viability to 50 % for both donor types, and was not prevented by the presence of mevalonolactone.
- Decreased cell viability was significantly prevented in primary human myotubes isolated from *M. obliquus internus abdominis* (LD) when treated with 1-40 µM simvastatin +/- 1 mM mevalonolactone.

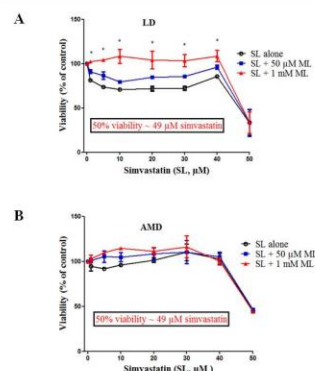


Figure 4. Cell viability was measured in differentiated primary human myotubes after exposure to simvastatin and mevalonate.

Primary human myotubes (LD; A, AMD; B) were preincubated with 0-50 µM simvastatin +/- 50 µM or 1 mM mevalonolactone for 48 hours. Cell viability was measured with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium colorimetric assay (MTS assay) (LD: \*p< 0.05 1-40 µM simvastatin +/- 1 mM mevalonolactone) (n=2-3).

#### Legumain activity is lower in AMD-donors compared to LD-donors

- Legumain activity appeared higher in LD-donors than in AMD-donors, but both donor types showed the same pattern of decreasing activity when exposed to simvastatin.
- The difference in activity may be due to different anatomic origin of the satellite cells, and needs to be further investigated.

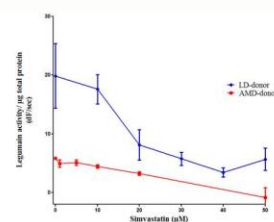


Figure 5. Legumain activity in LD- and AMD-donors. Primary human myotubes (LD and AMD, respectively) were incubated with simvastatin for 48 hours. Activities of legumain were measured with a peptide substrate as described.

### CONCLUSIONS

- Legumain and cathepsin B expressions and activities increase during differentiation of myotubes.
- Simvastatin showed a dose-dependent reduction in both the expressions and activities of legumain and cathepsin B (IC<sub>50</sub> ~ 18 µM).
- Simvastatin affected the cell viability (50 % viability ~ 49 µM simvastatin).